

**DnaA regulierte Transkription
im Replikationsorigin von E. coli
und Autorepression des dnaA Gens**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claudia Kücherer
aus Heidelberg

Berlin 1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548822_0001

Gedruckt mit Hilfe der Ernst-Reuter-Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

DnaA regulierte Transkription
im Replikationsorigin von E. coli
und Autorepression des dnaA Gens

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claudia Kücherer
aus Heidelberg

Berlin 1985

1. Gutachter: Professor Dr. Walter Messer

2. Gutachter: Professor Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1985

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	1
2 <u>Material und Methoden</u>	18
2.1 Abkürzungen	18
2.2 Chemikalien und Enzyme	20
2.3 Medien und Puffer	23
2.4 Bakterienstämme, Phagen und Plasmide	26
2.5 Phagen-Isolierung, Phagen DNA-Präparation	31
2.6 Plasmid-Präparation	31
2.7 Restriktionsverdaus und Ligierung von DNA	31
2.8 Transformation mit Plasmid DNA	32
2.9 Darstellung und Isolierung von DNA-Fragmenten	32
2.9.1 Agarosegel-Elektrophorese	32
2.9.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (nativ und denaturierend)	33
2.9.3 Autoradiographie	35
2.10 Reinigung von DNA mit Mikrostep-Gelfiltration und Dowex-Säulen	35
2.11 Alkalische Phosphatasebehandlung	36
2.12 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	36
2.12.1 5' Markierung mit T4-Kinase	36
2.12.2 3' Markierung mit Klenow-Polymerase	37
2.13 Darstellung von Proteinen im SDS/Polyacrylamidgel	37
2.14 RNA-Isolierung	38
2.15 S1-Mapping	39
2.16 <u>in vitro</u> Replikation und Transkription	42
2.16.1 Extraktpräparationen (Donor u. Rezipient)	42
2.16.2 <u>in vitro</u> Replikations- und Transkriptionsreaktion	44
2.17 DNA-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert	46

	Seite
3 <u>Ergebnisse</u>	47
3.1 Templateabhängiger Effekt des <u>dnaA</u> Proteins	47
3.2 auf die <u>in vitro</u> Transkription und Replikation	
3.2 <u>in vivo</u> Transkription im Replikationsorigin	52
3.2.1 5' Ende des 16 Kd Transkriptes	57
3.2.2 Termination des 16 Kd Transkriptes	67
3.3 Regulation der 16 Kd Transkription	72
3.3.1 16 Kd Transkription in <u>dnaA</u> Mutanten	73
3.3.2 16 Kd Transkription nach Induktion des	
<u>dnaA</u> Proteins	74
3.3.3 Termination der 16 Kd Transkription in <u>dnaA</u>	
und RNaseH-Mutanten	77
3.4 Regulation der <u>dnaA</u> Transkription	82
3.4.1 <u>dnaA</u> Transkription in <u>dnaA</u> Mutanten und nach	
Induktion des <u>dnaA</u> Proteins	84
3.4.2 Titration des <u>dnaA</u> Proteins	91
3.4.3 <u>dnaA</u> Transkription in <u>dam</u> -Mutanten	95
3.5 Klonierung und Überproduktion des <u>dnaA</u>	
Proteins	98
4 <u>Diskussion</u>	115
5 <u>Zusammenfassung</u>	125
6 <u>Literaturverzeichnis</u>	127

Lebenslauf

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem angefertigt.

Ich danke Prof. Dr. W. Messer und Dr. H. Lothar für die freundliche Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während dieser Arbeit. Für die angenehme Zusammenarbeit und zahlreichen Diskussionen möchte ich M. Schauzu, R. Kölling und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Messer danken.

Prof. Dr. T.A. Trautner danke ich für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten an diesem Institut; bei allen Mitgliedern der Abteilung Trautner möchte ich mich für das stets freundliche Entgegenkommen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. N.F. Käufer für die Beratung beim S1-Mapping und Dr. H.-J. Buhk für die Hilfe beim Sequenzieren.

Die zentrale Rolle der Initiation der Replikation
im Zellzyklus

Das Genom des gram-negativen Bakteriums Escherichia coli aus der Familie der Enterobacteriaceae ist ein zirkuläres DNA-Molekül. Jeder Zellteilung geht eine Duplikation des Genoms voraus und bei der Zellteilung erhalten beide Tochterzellen ein Chromosom. Damit ist die Konstanz der genetischen Information gewährleistet.

Die Replikation beginnt am Replikationsursprung, oriC (Bird et al, 1972; Louarn et al, 1974). Sie verläuft semikonservativ und bidirektional bis zum Terminus, ter, der dem Replikationsursprung auf der Genkarte gegenüberliegt (Masters and Broda, 1971; Louarn, 1977). Die Regulation der DNA-Synthese und auch der Zellteilung wird in erster Linie über die Initiationsfrequenz gesteuert. Die Zeit (C), die zur Replikation des Chromosoms benötigt wird, ist bei einer gegebenen Temperatur konstant, unabhängig von der Wachstumsrate der Zellen. Die Zellteilung erfolgt ebenfalls in einem konstanten Zeitabstand (D) zur Termination und somit zur Initiation (Maaløe and Kjeldgaard, 1966; Cooper and Helmstetter, 1968). Die dichotome Replikation des Chromosoms belegt die genaue Koordination der Initiation mit dem Zellwachstum. Ist die Generationszeit kürzer als die Zeit, die zwischen Initiation und Zellteilung verstreicht, wird die Replikation neu initiiert, bevor die zuvor begonnene Syntheserunde beendet ist. Je nach Generationszeit variiert die Anzahl der Replikationsgabeln in einer Zelle (gültig für Generationszeiten zwischen 18-60 min, C = 40 min, D = 20 min; Cooper and Helmstetter, 1968). Initiation erfolgt bei einer konstanten Initiationsmasse, d.h., wenn ein bestimmtes Verhältnis von Zellmasse zu chromosomalen Origins vorliegt (Donachie, 1968).

Initiationsmodelle

Basierend auf diesen Daten wurden früh zwei grundlegende Modelle für die Regulation der Initiation aufgestellt.

Das "Replikon-Modell" postuliert ein Strukturgen, das für ein Initiatorprotein kodiert, und eine Operatorsequenz, an dem das Initiatorprotein positiv die Initiation auslöst (Jakob, 1963). Das "Autorepressor-Modell" ist eine Weiterentwicklung davon. Es berücksichtigt die Konstanz der Initiationsmasse bei verschiedenen Wachstumsraten (Sompayrac and Maaløe, 1973). Demnach wird das Initiatorgen kotranskribiert mit einem Repressorgen, dessen Produkt das Operon konzentrationsabhängig kontrolliert. Dadurch wird die Konzentration des Initiatorproteins unabhängig von der Generationszeit nahezu konstant gehalten. Es wird proportional zur Volumen- bzw. Massenzunahme synthetisiert. Die notwendige Akkumulation des Initiators am Origin zur Auslösung des Initiationseignisses ist damit gewährleistet. Das Initiatorprotein wird bei der Initiation "verbraucht".

Das "Inhibitor-Dilution-Modell" schlägt eine negative Kontrolle der Initiation vor (Pritchard, 1969, 1978). Initiation erfolgt, wenn die Konzentration eines konstitutiv gemachten Repressors der Initiation durch Zellwachstum unter einen kritischen Wert verdünnt wird. Das Gen des Repressors liegt nahe des Replikationsorigins. Durch das Initiationseignis wird ein kurzfristiger Anstieg der Inhibitorsynthese ausgelöst. Nachfolgende Initiationen werden verhindert, bis die Inhibitorkonzentration wieder auf den Schwellwert abgesunken ist. Die weiterführenden genetischen und molekularen Analysen zeigen an, daß ein Modell mit negativ und positiv wirkenden Kontrollelementen erforderlich ist.

Initiation an oriC auf molekularer Ebene Minichromosomen

Minichromosomen sind Plasmide, die nur oriC als Replikationsorigin tragen und in der Zelle autonom replizieren. Die Isolierung der Minichromosomen ermöglichte die Sequenzierung der oriC DNA, sowie in vivo und in vitro Untersuchungen zur Funktionsweise und Kontrolle von oriC. Sie wurden u.a. aus spezialisiert transduzierenden λ oriC⁺asn⁺ Phagen isoliert, die in λ lysogenen Wirtstämmen trotz der Homoinmunität als Plasmid über oriC replizieren können (Meyenburg et al, 1978, 1979; Messer et al, 1978). Wichtige Vorarbeiten hatten die Kartierung von oriC nahe des asn Gens und damit seine Ausnutzung zur Selektion der λ oriC⁺asn⁺ Phagen ermöglicht (Bird et al, 1972; Hiraga et al, 1976; Marsh and Worcel, 1977; Meyenburg et al, 1977). oriC liegt zwischen dem ATP-Operon und dem asn Gen bei 83,5 min auf dem Chromosom (Meyenburg et al, 1978; Bachmann, 1983). Minichromosomen wurden auch direkt aus Restriktionsverdaus chromosomaler DNA kloniert (Yasuda and Hirota, 1977; Messer et al, 1978). Bei der Klonierung wurden Antibiotikaresistenzgene als selektionierbare Marker verwendet. Die Replikation der Minichromosomen zeigt in vivo und in vitro ähnliche Charakteristika wie die chromosomale Replikation (Meyenburg et al, 1978, 1979; Meijer and Messer, 1980; Fuller et al, 1981; Kaguni and Kornberg, 1984a). Möglicherweise unterscheidet sich ihre Initiationskontrolle von der des Chromosoms, da sie in Kopiezahlen bis zu 10 vorkommen. Sie sind sehr instabil; ohne Selektion gehen sie sehr rasch verloren und auch mit Selektion treten in hoher Frequenz plasmidfreie Zellen auf.

Struktur von oriC

Durch Deletionen wurde der minimal erforderliche Bereich zur autonomen Replikation auf ein 245 bp Fragment eingegrenzt (Pos. 23-267, Abb. 1; Oka et al, 1980). Unterschiedliche Fragmente aus der oriC Region wurden dazu in pBR322 kloniert. Diese Chimären können in einer polA Mutante nur replizieren, wenn sie einen funktionellen oriC besitzen. In der Sequenzanalyse des 422 bp Fragmentes (Pos. 1-417, Abb. 1; Messer et al, 1979; Meijer et al, 1979; Sugimoto et al, 1979; Hirota et al, 1979) zeichnet sich die oriC Struktur durch eine Anhäufung an invertiert repetitiven Sequenzen aus. Diese weisen 2 Symmetriezentren auf, die im Minimalorigin liegen (Buhk and Messer, 1983; Abb. 1). Der Vergleich der Originsequenz aus sechs verschiedenen gram-negativen Bakterien ergab, daß die konservierten Teile weitgehend Teil dieser symmetrischen Struktur sind (Zyskind et al, 1981, 1983; Buhk and Messer, 1983).

Auffällig ist die Anhäufung und Konservierung von Erkennungsstellen der dam-Methylase (GATC). Dam-Mutanten sind zwar lebensfähig (Marinus and Morris, 1973; Marinus et al, 1983), Minichromosomen können jedoch nicht in dam-Mutanten replizieren (Messer et al, 1985; Smith et al, 1985). Die Bedeutung der dam-Methylierung in der Replikation ist noch nicht verstanden.

Die Auswirkung von kleinen Deletionen, Insertionen und Punktmutationen auf die oriC⁺ Funktion zeigt, daß die konservierten Blöcke und die räumliche Distanz der Symmetrieelemente zueinander von Bedeutung sind (Oka et al, 1980; Hirota et al, 1981).

Die potentiell stark ausgeprägte Sekundärstruktur mit den konservierten Sequenzen deutet auf spezifische Protein-DNA Interaktionen hin. In vitro Bindungsstudien wiesen die spezifische Interaktion von dnaA Protein (Chakraborty et al, 1983; Fuller et al, 1983), Gyrase (Lother et al, 1984) und RNA-Polymerase (Morelli et al, 1981; Greene and Munson, 1981) nach. Alle drei Proteine sind spezifisch in die oriC Initiation involviert (s. Abschnitt über Priming und Initiationsproteine).

Das dnaA Protein erkennt und bindet kooperativ an ein 9bp Repeat, das viermal im Minimalorigin vorhanden ist (Fuller et al, 1984; Abb. 1). Dieses Repeat gehört zu den streng konservierten Sequenzblöcken. Ein weiteres 9bp Repeat befindet sich rechts des Minimalorigins, nahe dem 16kd Promotor (Abb. 1, Hansen et al, 1981). Die Gyrase, eine Topoisomerase II, die negative Superhelizität in DNA einführt, bindet im Bereich des rechten Symmetriezentrums (Abb.1). Die Bindung erfolgt spezifisch, unabhängig davon ob die DNA superhelikal, relaxiert oder linear vorliegt, was eher auf die Erkennung einer Sequenz als einer Struktur schließen läßt (Lother et al, 1984). Die RNA-Polymerase Bindungsstelle liegt in demselben Bereich und wurde als zwei divergent transkribierte Promotoren identifiziert (Lother and Messer, 1981). In vitro werden 2 kurze Transkripte synthetisiert. Ihre Rolle ist unbekannt; denkbar sind Funktionen als Primer RNA oder inhibitorische RNA (s. Abschnitt über Priming und Initiationsproteine).

Zudem bindet das Membranprotein B' an 2 Stellen der oriC DNA; es erkennt in vitro spezifisch einzelsträngige oriC DNA (Abb. 1; Jacq et al, 1983). Von zwei weiteren Membranproteinen ist die in vitro Bindung an doppelsträngige oriC DNA beschrieben (Hendrickson et al, 1982;

Kusano et al, 1984). Die Bindung des Chromosoms an die Membran über den Replikationsorigin kann für Regulation der Replikation und die Verteilung der Chromosomen an die Tochterzellen von Bedeutung sein (Jakob, 1963).

Zu beiden Seiten des Minimalorigins liegen Gene, deren Funktion teilweise nicht bekannt ist. Direkt links des Minimalorigins befindet sich das Gen für ein 70kd Protein, gidA. Möglicherweise ist es in die Zellteilung involviert (Meyenburg and Hansen, 1980). Es gibt Hinweise, daß DNA-Sequenzen im Bereich des 5'Endes des gid-Genes zur oriC Funktion erforderlich sind (Tabata et al, 1983; Zyskind, pers. Mitteilung).

Zwischen dem asnA Gen und dem Minimalorigin sind offene Leserahmen für ein 16kd und 17kd Protein. Beide Gene werden von einem eigenen Promotor aus in Richtung oriC transkribiert (Lothar et al, 1981); Hansen et al, 1981; Morita et al, 1981). Das 17 kd Protein ist als asnC, ein autoregulierter Aktivator der asn-Transkription identifiziert (Kölling et al, 1985; zur Publ. eingereicht). Das 16 kd Protein wird wahrscheinlich exprimiert, für eine Funktion gibt es noch keinen Hinweis (Hansen et al, 1981; Kölling et al, zur Publ. eingereicht).

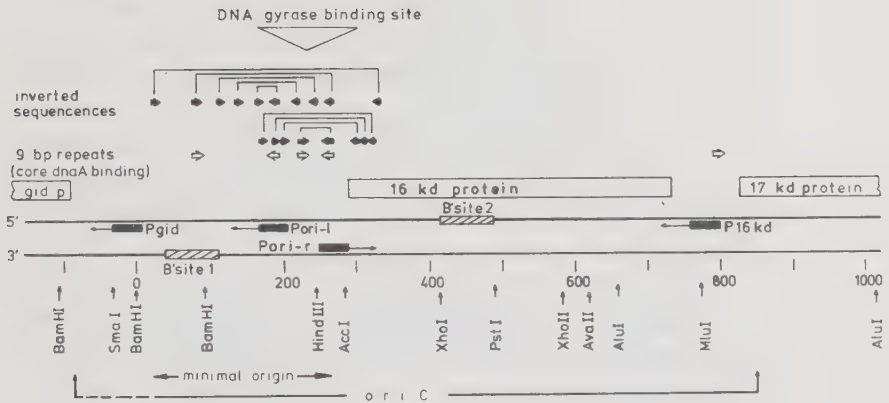


Abb. 1: Struktur der *oriC* Region

Der Minimalorigin, der bisher als ausreichend für die *oriC* Funktion charakterisiert war, ist durch Pfeile gekennzeichnet. *oriC* mit 16kd-Region als integralem Bestandteil, wie er aufgrund der Ergebnisse in der hier vorgelegten Arbeit als funktionaler Replikationsorigin definiert wird, ist durch die große Klammer eingegrenzt. Der gestrichelte Teil der Klammer zeigt die konservierte Region an, die möglicherweise für die Originfunktion wichtig ist (Tabata et al, 1983; Zyskind, J., pers. Mitteilung). Promotoren sind durch schwarze Balken gekennzeichnet, die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. Die Leserahmen der Proteine sind durch offene Balken angegeben. Die offenen Pfeile repräsentieren die Bindungsstellen des *dnaA* Proteins, das Dreieck zeigt das Zentrum der Gyrasebindung an, die schraffierten Balken die B'-Bindungsstellen. Die invertiert repetitiven Sequenzen sind mit Klammern verbunden. Die Koordinaten beziehen sich auf das Minichromosom pCM959 (Abb. 1a); einige wichtige Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

Es gibt einige Hinweise, daß die 16kd-Region in die komplexe Replikationskontrolle involviert ist: Eine B'-Bindungsstelle befindet sich hier. Minichromosomen mit 16kd-Region sind stabiler und haben eine höhere Kopiezahl als Minichromosomen, die nur den Minimalorigin tragen (Chakraborty, 1982; Huhle, 1984; Meyenburg et al, 1984). Die Bidirektionalität der Replikation korreliert mit diesem Bereich. Minichromosomen mit 16kd-Region replizieren in vivo überwiegend bidirektional; ohne 16kd-Region (Pos. 1-417, Abb. 1) verläuft ihre Replikation überwiegend unidirektional (Meijer and Messer, 1980). Die in vitro Analyse der Replikationsrichtung eines ähnlichen M13-oriC Hybrids ergab allerdings bidirektionale Synthese (Kaguni et al, 1982). Der Minimalorigin nach Oka et al (1980) repliziert in vitro unidirektional (Kaguni und Kornberg, 1984; Yamaguchi et al (1982) charakterisierten den 16kd-Bereich als Inkompatibilitätsregion, incB (Pos. 280-1050), neben incA, dem Minimalorigin. Plasmide, die incB tragen, verursachen Inkompatibilität gegenüber Minichromosomen in der gleichen Zelle. Stuijke and Meijer (1983) grenzten die incB-Region auf den 16kd Promotor ein. Die bereits erwähnte dnaA Bindungsstelle, distal des 16 kd Promotors gehört zu incB.

Das "Priming" der DNA-Synthese und Initiationsproteine

Initiation der DNA-Synthese erfordert einen Primer mit freiem 3'OH Ende, an das die DNA-Polymerase III das erste dNTP koppeln kann. In der Regel fungieren RNA-Moleküle als Primer. Die Primer-Synthese bzw. ihre Kontrolle ist somit der zentrale Schritt in der Initiation.

Die Komplementärstrangsynthese einzelsträngiger Phagen, die von Wirtsproteinen abhängig ist, dient als Modell für das Priming an oriC. Der Primer kann zum einen von der RNA-Polymerase synthetisiert werden (M13), zum anderen durch die Primase (dnaG Protein) wie beim Phagen G4 oder durch die Primase in einem Multiproteinkomplex, dem Primosom, wie beim Phagen Phi X174 (Kornberg, 1980).

In der Initiation der bidirektionalen Replikation von E. coli muß das "Priming" des "leading" und "lagging" Stranges an beiden Replikationsgabeln gewährleistet sein. Der Mechanismus und ihre Regulation ist dabei noch nicht verstanden. Für die Initiation des "leading" Stranges ist Aktion von Primase oder RNA-Polymerase vorstellbar: Einerseits gibt es Sequenzhomologie zum G4-Origin (Meijer et al, 1979), andererseits könnten die Transkripte im Replikationsorigin Primerfunktion übernehmen. Das Primosom-Modell ist für die Initiation des "lagging" Stranges in Diskussion. Voraussetzung für die Zusammensetzung des Primosoms (n, n', n'', dnaB, dnaC, dnaG) ist das Vorhandensein einer Erkennungssequenz für das n' Protein (Louarn et al, 1981). Es konnte bisher kein in vivo aktives Initiationssignal im Origin nachgewiesen werden, das die Primosomzusammensetzung nach dem Phi X174 Modell erlaubt (Stuitje et al, 1983). Für die weitere diskontinuierliche Synthese des einmal initiierten "lagging" Stranges scheint das Primosom-Modell zuzutreffen (Okazaki et al, 1980; Louarn et al, 1981).

Es gab einen frühen Hinweis auf die direkte Beteiligung der RNA-Polymerase an der Initiation: Initiation ist abhängig von de novo Proteinsynthese, aber Rifampicin wirkt noch nach dem chloramphenikolsensitiven Schritt hemmend (Lark, 1963; Lark, 1972; Messer, 1972).

Im in vitro Replikationssystem wurde die Abhängigkeit der Initiation von RNA-Polymerase bestätigt (Fuller et al, 1982).

Die Charakterisierung von temperatursensitiven Initiationsmutanten und Suppressormutanten sowie die teilweise Zerlegung und Rekonstitution des oriC spezifischen in vitro Replikationssystems ermöglichte die Identifizierung weiterer Proteine, die an der Initiation beteiligt sind.

Als temperatursensitive Initiationsmutanten wurden dnaB252, dnaC, dnaJ, dnaK, dnaA (Wechsler, 1978) und Gyrase-Mutanten isoliert (Orr et al, 1979; Orr and Staudenbauer, 1981).

Die Mutanten dnaJ und dnaK sind im Hinblick auf ihre Initiationsfunktion wenig untersucht. Die Proteine dnaB und dnaC sind als Komplex essentielle Bestandteile des Primosoms (Wickner and Hurwitz, 1975; Kornberg, 1980). dnaB252 hat im Gegensatz zu Elongationsmutanten von dnaB noch seine ATPase-Aktivität (Lanka et al, 1978). Es ist defektiv in der Interaktion mit anderen Initiationsproteinen. dnaB Protein und RNA-Polymerase werden gleichzeitig gebraucht. Das dnaC Protein agiert erst nach dnaB und RNA-Polymerase, wahrscheinlich beim Einbau des ersten dNTPs (Messer et al, 1973; Zyskind et al, 1977). Im in vitro System konnte gezeigt werden, daß neben den Primosomproteinen dnaB und dnaC auch SSB zur Initiation am oriC erforderlich ist (Kaguni and Kornberg, 1984). SSB Protein bindet an einzelsträngige DNA und ist in den genannten Phagensystemen zur spezifischen Originerkennung durch RNA-Polymerase, Primase oder n'Protein nötig.

Das dnaA Protein ist vor dnaC Protein am RNA-Syntheseschritt beteiligt (Hiraga and Saitoh, 1974; Messer, 1975; Kung and Glaser, 1978). Es ist ein spezifisches Initiationsprotein für oriC, wie die integrative Suppression des dnaA-Phänotyps durch R- oder F-Faktoren zeigt (Nishimura et al, 1971; Louarn et al, 1977). Replikation beginnt bei nicht permissiver Temperatur am Origin des integrierten Faktors. Bisher ist nur ein anderes Replikon, psCl01, bekannt, das dnaA abhängig ist (Frey et al, 1979). Die Abhängigkeit der oriC Replikation von dnaA Protein wurde im in vitro System bestätigt (Fuller et al, 1982).

Seine Rolle in der Regulation der Initiationsfrequenz ist umstritten. Reversible dnaA Mutanten, die bei nicht permissiver Temperatur gehalten werden, häufen "Initiationskapazität" an; nach Wechsel zur permissiven Temperatur findet Überinitiation statt (Hansen and Rasmussen, 1977; Messer et al, 1975; Tippe Schindler et al, 1979; Lycett et al, 1980). Bei intermediären Temperaturen nimmt die Originkonzentration ab. Eine Interpretation war, daß das dnaA Protein die Initiationsfrequenz positiv reguliert und gleichzeitig sein eigener Repressor ist (Hansen and Rasmussen, 1977). Bei nicht permissiver Temperatur würde inaktives dnaA Protein wegen fehlender Autoregulation überproduziert und würde bei Wechsel zur permissiven Temperatur und Aktivierung des Proteins zur Überinitiation führen. Diese Interpretation wurde in der Folge angezweifelt.

Eine Vielzahl von Suppressormutationen der dnaA Mutanten kartieren im rpoB-Gen (β -Untereinheit der RNA-Polymerase; Bagdasarian et al, 1977; Schaus et al,

1981; Atlung, 1981, 1984). Eine physikalische Interaktion zwischen dnaA Protein und RNA-Polymerase ist damit denkbar.

Es gibt Hinweise, daß der RNA-Syntheseschritt die Initiationsfrequenz bestimmt. Temperatursensitive Mutanten mit erhöhter Originkonzentration wurden im rpoB und rpoC Gen lokalisiert (8 und 8'UE, Tanaka et al, 1983; Rasmussen et al, 1983). In diesen Mutanten nimmt bei intermediären Temperaturen die Initiationsfrequenz zu, entgegengesetzt dem Verhalten von dnaA Mutanten. Im in vitro System weist die Replikation bei Komplementation mit optimalen Mengen an dnaA Protein eine "lag" Phase auf, die durch Präinkubation mit RNA-Polymerase eliminiert wird (Fuller et al, 1981; Fuller and Kornberg, 1983).

Die Beteiligung von Topoisomerase I und RnaseH als Spezifikationsproteine in der Initiation an oriC wurde durch dnaA Suppressionseffekte entdeckt. Deletion der Topoisomerase I (topA) in dnaA Mutanten supprimiert den dnaA Phänotyp (Louarn et al, 1984). Komplementation mit plasmidkodierter Topoisomerase I restauriert den dnaA Phänotyp. Wie die dnaA Suppression zustande kommt, ist noch nicht verstanden. Topoisomerase I ist ein DNA relaxierendes Enzym und damit ein Gegenspieler zur DNA Gyrase. In topA Mutanten ist die negative Superhelizität der DNA verändert (Pruss et al, 1982). Negative Superhelizität des Templates erleichtert die Bindung des dnaA Proteins und ist zur Initiation der Replikation erforderlich (Fuller et al, 1984; Fuller et al, 1981). Gyrase ist in vivo und in vitro in die Initiation involviert (Orr et al, 1979; Fuller et al, 1981). Ob Topoisomerase I und Gyrase nur durch

die Topologiekontrolle der Origin-DNA an der Initiation beteiligt sind, ist fraglich. Topoisomerase I verhindert im in vitro System Initiation außerhalb von oriC (Kaguni and Kornberg, 1984b), Gyrase bindet eher sequenz-spezifisch an oriC (Lothar et al, 1984), die Transkription in oriC wird durch Gyrase beeinflusst (Filutowicz and Jonczyk, 1981).

In der Rekonstitution des in vitro Systems wurde HU (Helix unwinding) als Protein charakterisiert, das in der Initiation an oriC spezifisch stimulierend wirkt (Dixon and Kornberg, 1984). HU verursacht zusammen mit Topoisomerase I die nukleosomähnliche Strukturierung der DNA (Yaniv-Rouvière et al, 1979), wodurch die Funktion der beiden Topoisomerasen in der Topologiekontrolle der oriC DNA an Gewicht erhält.

RNase H Mutanten können unabhängig von dnaA und oriC replizieren (Kogama and Meyenburg, 1983; Ogawa et al, 1984; de Massy et al, 1984; Horuichi et al, 1984). Die "stable replication" Mutanten (sdrA), die trotz Proteinsynthesehemmung recA abhängig kontinuierlich DNA synthetisieren (Kogama, 1978) und die dnaA Suppressor Mutante dasF (Atlung, 1981) sind defektiv in der RNaseH (Ogawa et al, 1984). In ori-Deletionsstämmen erfolgt die Initiation außerhalb von oriC (de Massy et al, 1984). Die derzeitige Vorstellung ist, daß RNaseH potentielle Primer außerhalb von oriC eliminiert (Ogawa et al, 1984). Die Initiation der Replikation kann auch durch Interaktion von komplementären RNA-Molekülen reguliert sein. Die Analyse der Inkompatibilitätsfunktionen und Kopiezahlkontrolle einiger Plasmide enthüllte die potentielle Rolle von kurzen komplementären Transkripten.

Bei den Plasmiden des ColEI Typs wird das Prozessieren des Primers (RNA II) von RnaseH am 3'Ende durch Hybridisierung mit einem komplementären kurzen RNA- Transkript (RNA I) am 5'Ende inhibiert. Nur der prozessierte Primer kann von DNA-Polymerase I zur DNA-Inzeption verwendet werden (Tomizawa et al, 1981, 1982, 1984; 1985; Tomizawa and Som, 1984; Cesareni et al, 1982).

Bei den Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppe IncFII und pT 181 (Staph. aureus) wird die Translation der mRNA des positiv gebrauchten Replikationsproteins (rep) durch Hybridisierung mit einem komplementären kurzen RNA Transkript im Bereich des 5'Endes inhibiert (Rosen et al, 1981; Light and Molin, 1983; Nordström et al, 1984; Womble et al, 1984; Kumar and Novick, 1985). Sowohl die Primerbildung als auch die Verfügbarkeit des rep Proteins wird jeweils als die limitierende Funktion in der Replikation dieser Plasmide betrachtet. Beide Prozesse werden noch durch eine zusätzliche Komponente negativ reguliert (rop Protein bzw. copA Protein).

Aufgabenstellung

Regulation und Realisierung der Initiation ist die zentrale und noch offene Frage der E.coli Replikation. Die oriC spezifischen Initiationsproteine RNA-Polymerase und dnaA Protein sind an einem frühen Ereignis in der Initiation involviert (Zyskind et al, 1977). Sie sind dabei entweder in einer gemeinsamen Reaktion oder in sehr dicht beieinanderliegenden Reaktionsschritten aktiv. Dieses frühe Ereignis bestimmt möglicherweise die Initiations-

frequenz. Nach dem Autorepressor-Modell ist für ein regulatorisches Initiationsprotein kontrollierte Expression zu fordern (Sompayrac and Maaløe, 1973). Die Existenz einer dnaA Bindungsstelle in der Promotorregion des dnaA-Gens (Hansen et al, 1982a; Fuller et al, 1984) und die Anhäufung der Initiationskapazität in reversiblen dnaA Mutanten bei restriktiver Temperatur läßt eine Autorepression der dnaA Expression möglich erscheinen (Hansen and Rasmussen, 1977). Supressormutanten des dnaA (ts) Phänotyps in der RNA-Polymerase legen eine physikalische Interaktion beider Proteine nahe (Bagdasarian et al, 1977; Atlung, 1981; Schaus et al, 1981). Zwei Fragestellungen, die daraus resultieren, werden in dieser Arbeit untersucht:

1. Reguliert das dnaA Protein Transkription im Replikationsorigin?
2. Reguliert das dnaA Protein seine eigene Transkription?

Die 16kd-Region wurde aufgrund ihrer besonderen Merkmale (incB, 9 bp Repeat etc.) von vornherein in die Analyse mit einbezogen.

DnaA abhängige Transkription wurde im in vitro Replikationssystem in Abhängigkeit von verschiedenen Templates untersucht. die 16kd-Region schien Ursache für einen dnaA abhängigen Repressionseffekt zu sein.

Um den Einfluß des dnaA Proteins auf spezifische Transkripte im Replikationsorigin zu untersuchen, sollten zunächst die Transkripte der oriC Region in vivo mit Hilfe des S1-Mappings charakterisiert

werden. Nach Festlegung von Start und Termination des 16kd Transkriptes wurde der Effekt von dnaA Protein auf die 16kd Transkription untersucht. Dazu war die Konstruktion eines dnaA überproduzierenden Plasmids erforderlich. Um einen Hinweis auf die Funktion der dnaA regulierten Transkription zu erhalten, wurde die Termination der 16kd Transkription in dnaA und RnaseH Mutanten untersucht.

Die Regulation der dnaA Transkription auf dem Chromosom wurde ebenfalls mit Hilfe des S1-Mappings untersucht.

Die Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß die 16kd-Region essentieller Bestandteil eines vollregulierten Replikationsorigins ist. Aufgrund der Ergebnisse wird ein Initiationsmodell vorgeschlagen, in dem die regulierte 16kd Transkription und die regulierte Prozessierung des 16kd-Transkripts die zentrale Rolle in der Regulation der Initiation einnehmen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
cpm	counts per minute
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatrium-salz
EGTA	Ethylenglykol-bis (oxyethylenitril) tetraessigsäure
ETBr	Ethidiumbromid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaar
Kd	Kilodalton
Km	Kanamycin
MW	Molekulargewicht
M	Größenstandard
NaOAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PEG	Polyäthylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis 2-ethansulfonsäure
Pos.	Position
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tc	Tetrazyklin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

2	unit
XC	Xylencyanol

2.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Biorad, Richmond, Calif., USA
Ammoniumpersulfat	Biorad, Richmond, Calif., USA
p-Aminobenzamidin	Sigma, Heidelberg (Nr.A-7142)
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
cAMP	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue (R250)	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfat	EGA-Chemie, Steinheim
Dowex	Fluka, Neu-Ulm (1x8, 50-100 mesh, Nr. 44 509)
dNTPs	Boehringer, Mannheim
Dialysesschläuche	Spectrum, Medical Industries, L.A., USA
DTT	Sigma, St. Louis, USA
EtBr	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Harnstoff (ultrapur)	BRL, Bethesda, USA
HEPES	Pharmacia, Uppsala
Hydrazin (95)	Serva, Heidelberg
IPTG	Sigma, St. Louis, USA
Kalbsthymus DNA	Worthington, New Jersey
Kreatinphosphat	Boehringer, Mannheim
Membranfilter	Sartorius, 0.45 µm
Mixed bed Ionenaustauscher	Biorad, Richmond, USA
Natriumkakodylat	Fischer Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Nitrozellulosefilter	Millipore, Bedford, USA
PEG 6000	Sigma, St. Louis, USA
Piperidin	EGA-Chemie, Steinheim
PIPES	Calbiochem, La Jolla, USA
radioaktiv markierte Nukleotide	Amersham Buchler, Braunschweig

rNTPs	Boehringer, Mannheim
Sephadex LH 60	Pharmacia, Uppsala
Spermidin	Serva, Heidelberg
tRNA (E.coli)	Boehringer, Mannheim
TEMED	Biorad, Richmond, Calif., USA
Tetrazyklin	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
X-Ray Film	Kodak

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck,
Darmstadt bezogen.

Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von wechselnden Herstellern bezogen: Biolabs, Beverly, USA; Boehringer, Mannheim; BRL, Bethesda, USA.

alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Boehringer, Mannheim
Dnase I	Boehringer, Mannheim
Kinase (T4)	BRL, Bethesda, USA
Klenow-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Kreatin-Kinase	Boehringer, Mannheim
Ligase (T4)	BRL, Bethesda, USA
Lysozym	Serva, Heidelberg
Mung Bean Nuklease	Pharmacia, Uppsala
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RnaseA	Boehringer, Mannheim
S1-Nuklease	BRL, Bethesda, USA

2.3 Medien und Puffer

L-Medium:

10	g	Bacto Trypton (Difco)
5	g	Bacto Yeast Extrakt (Difco)
10	g	NaCl
0,3	ml	1N NaOH

pro 1 dest. H_2O

L-Agar:

Zusammensetzung wie L-Medium,
zusätzlich:

15	g	Bacto-Agar (Difco)
----	---	--------------------

TY-Medium:

10	g	Trypton (Difco)
5	g	Yeast Extrakt
5	g	NaCl
0,3	ml	1N NaOH

pro 1 dest. H_2O

008-Medium:

2	g	NH_4Cl
6	g	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
3	g	KH_2PO_4
3	g	NaCl
0,175	g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

pro 1 dest. H_2O

NB-Medium:

8	g	Nutrient Broth (Difco)
5	g	NaCl

pro 1 dest. H_2O

M9-Medium:

100	ml	10x Salze	} steril
10	ml	10mM CaCl_2	
10	ml	100mM MgSO_4	

auf 1 l mit sterilem H_2O
ergänzen

10x Salze:	70	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
	10	g	NH_4Cl
	30	g	KH_2PO_4
	5	g	NaCl

pro 1 dest. H_2O

Puffer:

10 x TA:

108	g	Tris
55	g	Borsäure
8,3	g	EDTA

pro 1 bidest. H_2O ; pH 8.3

10 x TBE-S:

für Sequenzgele

50,5	g	Tris
30,5	g	Borsäure
40	ml	EDTA pH 7.4, 0.5 M

pro 1 bidest. H_2O

TE-Puffer:

10	mM	Tris-HCl pH 8.0
0,1	mM	EDTA pH 8.0

SM-Puffer:

100	mM	NaCl
10	mM	Tris-HCL pH 7.5
10	mM	MgSO_4
0,02	%	Gelatine

10 x Kinase-Puffer:

500 mM Tris-HCl pH 7.6
100 mM MgCl_2
50 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM EDTA

10 x Klenow-Puffer:

500 mM Tris-HCl pH 7.2
100 mM MgSO_4
1 mM DTT

10 x CIP-Puffer:

500 mM Tris-HCl pH 9.0
10 mM MgCl_2
1 mM ZnCl_2
10 mM Spermidin

10 x Ligase-Puffer:

700 mM Tris-HCl pH 7.5
70 mM MgCl_2
1 mM ATP
100 mM DTT

2.4 Bakterienstämme, Plasmide und Phagen

Bakterienstämme:

* wm 351 *

orig.name: PC5

chr.markers: deoC3, dnaA5, lambda-, leuB6, rps1 153,
supE42, thyA47

comm./ref.: derivative of W1485. Carl, Mol.Gen.Genet.
109,107,1970

tests/ref.: ts!-70.*10,23.10/82:rps1+.

* wm 433*

orig.name: derivative of WM301 (dnaA204)

chr.markers: arg-28, deoB23, dnaA204, gal-11, his-47,
hsdS-K12, lac-11, leu-19, mal, met-55,
pro-19, rps156, sul-1, thyA59, trp-25

comm./ref.: derivative of WM301 (E.c.B/r with K12
restr.modif.). Beyermann, Messer &
Schlicht, J.Bact. 118, 783, 1974

tests/ref.: ts!*29/30.Isolate#:dnaA993.2/81:leu,
pro,his,arg,thy,trp,met,ts,lac

* wm 647 *

orig.name: CM993

plasmid: pCM959:asnA+

host: WM648

chr.markers: asnA31, asnB32, lambda-, recA1, relA1,
spoT1, thi-1

comm./ref.: Meijer et al, PNAS 76, 580, 1979.v.
Meyenburg et al., ColdSpr.Harb.Symp.
43, 121, 1979. Grow in Min +casam.acids
+thi, but-asn!

tests/ref.: *37, Same as WM963.

* wm 648 *

orig.name: CM987
chr.markers: asnA31,asnB32,lambda-,recA1,relA1,
spot1,thi-1
comm./ref.: F-derivative ofCM924:v.Meyenburg
et al., MGG 160,287,1978
tests/ref.: 8/83:asn

* wm 734 *

orig.name: derivative of C600 (WM68)
chr.markers: lacY1,lambda-,leuB6,rpsL,supE44,
supK?,thi-1,thr-1,tonA21
comm.ref.: M.Achtman.
tests/ref.: 4/82:rpsL,supK?

* wm1091 *

orig.name: GM119
chr.markers: dam-3,dcm-6,galk2,galt22,lacY1,metB1,
mtl-1?,supE44,thi-1?,tonA31?,tsx-78
comm./ref.: Marinus & Morris,MGG 149,273,1976.
From J.E.Brooks.
tests/ref.: *46.5/81:met,lac.

* wm1140 *

orig. name: derivative ofWM1032 (recA)
chr.markers: dnaA508,ilvB or ilvG,lac,recA56,
srlC300::Tn10,supD,thi,trp
comm./ref.: Ilv+,Val-rest.,recA by P1 (WM697).
tests/ref.: ts12/82:recA,Tc,ts.

* wm1151 *

orig.name: derivative of WM1129 (recA)
chr.markers: lacIqLb,lambda-,recA56,srlC300::Tn10
comm./ref.: recA by P1 (WM697).Tc.
tests/ref.: 3/82:recA,Tc.JK3,lac auf McConkey,
lac+ auf X-gal+IPTG.

* wm1153 *

orig.name: derivative of WM1152 (recA)
chr.markers: dnaA204,ilvB or ilvG,lacIqLB,lambda-,
recA56,srlC300::Tn10
comm./ref.: recA by P1(WM697).ilv+,val-resist.
tests/ref.: ts!JK3.3/82:val-res.,ts,recA,Tc.

* Wm1290 *

orig.name: TC1430
plasmid: pNF2690:Km,CI857(lambda);pTC1415:Ap,
dnaA+
host: CR34
chr.markers: deoC1,lacY1,lambda-,leuB6,supE44,
thi-a,thr-1,thyA6,tonA21
comm./ref.: From T.Atlung.pNF2690-pACYC177 with
lambda cI857 gene.pTC1415=pBR327 with
dnaA gene (SacII-XhoI) after lambda-pL.
tests/ref.: s!*96.9/83:thr,leu,thy.

* wm1332 *

orig.name: GM119/pdam118
plasmid: pdam118:Ap,dam+
host: WM1091
chr.markers: dam-3,dcm-6,galk2,galt22,lacY1,
metB1,mtl-1?,supE44,thi-1?, t onA31?,
tsx-78
comm/ref.: From J.E.Brooks via R.Kahmann.pdam118-1.
14kb BamHI-PvuII dam fragm. in BamHI-
PvuII of pBR322. Brooks et al., NAR 11,
837,1983
tests/ref.: 1/84:met,gal,lac,Ap.

* wm1343 *

orig.name: EC559
chr.markers: ara-14, argE3, del (gpt-proA) 62, galK2,
his-4, lacY1, lambda-, leuB6, mtl-1,
rpsL31, supE44, thi-1, tsx-33, xyl-5
comm./ref.: derivative of AB1157. From P. Polaczek.
Ciesla & Gpolaczek, MGG 1984 in press.

* wm1344 *

orig.name: EC558 (derivative of WM1343)
chr.maerks: ara-14, argE3, del (gpt-proA) 62, dnaA46,
galK2, his-4, lacY1, lambda-, leuB6, mtl-1,
rpsL31, supE44, thi-1, tsx-33, xyl-5
comm./ref.: derivative of AB1157. From P. Polaczek.
Ciesla & Polaczek, MGG 1984 in press.
tests/ref.: ts! Good scoring for ts.

* wm1382 *

chr.markers: rnh::Tn3, thyA36
comm./ref.: From Horiuchi via Hillenbrand. Deri-
vative of WM3110. Probably rnh1::Tn3,
Horiuchi et al., MGG 195, 17, 1984.
tests/ref.: *108. Requires CAS for growth. WM1382
AND 1383 show const. SDR.

Plasmide

pOC 42 (Messer et al, 1982)
pOC 51 (Chakraborty, 1982)
pOC 82 (Messer et al, unveröffentlicht)
pBP 8 (Ceglowski and Trautner, 1984)
pJF 118 u (J.-P. Fürste, E. Lanka, in Vorbereitung)
pHPC 1 (Chakraborty, 1982)
pLSK 3 (diese Arbeit)
pLSK 4 (diese Arbeit)
pLSK 5 (diese Arbeit)

Phagen

- A 47.16 (Chakraborty, 1982; Chakraborty et al,
1983)
A 607.8 (Chakraborty, 1982)

2.5 Phagen-Isolierung, Phagen DNA-Präparation

Phagenlysate wurden nach der Methode von Blattner et al (1977, Preadsorb, Dilute and Shake; Chakraborty, 1982) gewonnen. Die Phagen wurden aus dem Lysat entweder durch Zentrifugation sedimentiert (Chakraborty, 1982) oder mit PEG/NaCl ausgefällt (Loenen and Brammar, 1980). Die Phagen wurden über einen CsCl-Stufengradienten gereinigt (Maniatis, 1982) und nach Dialyse gegen SM-Puffer die DNA mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde in TE-Puffer aufbewahrt.

2.6 Plasmid-Präparationen

Die Plasmide wurden nach der Methode von Katz et al (1973; Klarlysat) isoliert (ohne Amplifikation). Nach Isolierung der superhelikalen Plasmide aus dem isopychnischen CsCl-Gradienten wurde das EtBr mit Propanol-2 extrahiert (CsCl/H₂O gesättigt). Die Plasmidlösung wurde dialysiert und die Plasmide durch Phenol-Extraktion gereinigt. Die DNA wurde in TE-Puffer aufbewahrt.

Zur schnellen Untersuchung von Transformanden wurde die Plasmid DNA aus Minilysaten von 2 ml Übernachtskultur präpariert (Holmes and Quigley, 1981).

2.7 Restriktionsverdau und DNA-Ligierung

Die Pufferbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. 1-3u Enzym/ μ g DNA wurden in der Regel verwendet und die Ansätze 1-3 h inkubiert.

Zum Schneiden der [³²P]-endmarkierten DNA-Fragmente, um einseitig markierte Hybridisierungsproben zu erhalten, waren ein Überschuß an Restriktionsenzym und längere Inkubationszeiten erforderlich.

2.8 Transformation mit Plasmid DNA

Transformation von E.coli Zellen wurde nach Brown et al (1979) durchgeführt. Nach phänotypischer Expression wurde das Transformationsgemisch auf L-Platten mit den erforderlichen Antibiotikazusätzen plattiert (Ap: 50 µg/ml, Tc: 5 oder 10 µg/ml, Km: 50µg/ml).

2.9 Darstellung und Isolierung von DNA-Fragmenten

2.9.1 Agarosegel-Elektrophorese

0,7%-1,5%ige Agarosegele (horizontal) wurden zur Darstellung und Isolierung großer DNA-Fragmente verwendet (Maniatis, 1982). Die Elektrophorese wurde mit Tris-Acetat Puffer durchgeführt, dem 0,5 µg/ml EtBr zugesetzt war. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert. Zum Auftragen der Proben wurde 1/5 Volumen Probenpuffer zugesetzt (15 % Ficoll 400, 0,25% BPB).

Zur Präparation von DNA-Fragmenten (wenn sie zur Markierung verwendet werden sollten) wurde die Elektrophorese ohne EtBr durchgeführt. Ein Kontrollstreifen wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit EtBr angefärbt, die Bandenpositionen vermessen und entsprechend aus dem Gel ausgeschnitten. Die Agarose-Gelstreifen wurden in Dialyseschläuche (Spectrapor 3) verpackt und die DNA durch Elektrophorese eluiert (1/2 TA, 2-4 h, 50-100 V). Um die quantitative Elution zu kontrollieren, wurde die Elution des größten angefärbten Fragmentes des Kontrollstreifens (in separatem Dialyseschlauch) verfolgt. Die Spannung wurde nach Beendigung der Elektro-Elution kurz umgepolt (30 sec). Das Eluat wurde mit Butanol-2 eingengt und phenolisiert (2-3). Die Fragmente wurden in TE-Puffer aufbewahrt.

2.9.2 Polyacrylamidgel - Elektrophorese

nativ: Zur Darstellung von kleinen DNA-Fragmenten (Maniatis, 1982) und Präparation von [^{32}P]-markierten Fragmenten wurden 6-8%ige Polyacrylamidgele verwendet.

Zusammensetzung: (150 ml)

<u>6%</u>		<u>8%</u>		
31	ml	36	ml	29% Acrylamid (1% Bisacrylamid)
7,5	ml	7,5	ml	10 x TBE
111,5	ml	106,5	ml	H ₂ O
75	mg	75	mg	APS
100	μl	100	μl	TEMED

Vor Zugabe von TEMED und APS wurde das Gemisch entgast. Die Elektrophorese wurde mit TBE-Puffer in einer vertikalen Apparatur durchgeführt (Spacer 1,5 mm, 35 cm lange Glasplatten). Das Gel wurde vor dem Auftragen der Proben mindestens 1 h (2-4 h ist für präparative Gele besser) bei 150 V vorelektrophoretisiert. Zum Auftragen der Proben wurde derselbe Ladepuffer wie in 2.9.1 verwendet. Die DNA wurde zuvor phenolisiert. Präparative Gele wurden in der Regel 8-12 h elektrophoretisiert.

Nach Anbringen von Positionsmarkern (präparative Gele für markierte Fragmente) mit radioaktiver Tinte wurde ein Kodak X-Ray Film aufgelegt und solange exponiert wie erforderlich (5 min - 30 min). Entsprechend dem Autoradiogramm mit den Positionsmarkern wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde wiederum mit Elektro-Elution aus den Polyacrylamid-Gelstreifen isoliert (1/2 TBE-Puffer, 150 V). Nach Einengung des Volumens mit Butanol-2 und Phenol-Extraktion (3x) wurde die DNA in TE aufbewahrt.

denaturierende Gele (Sequenzgele)

Zur Analyse der S1-geschützten DNA-Fragmente oder sequenzierter Fragmente wurde die DNA in denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoffgelen dargestellt.

Zusammensetzung: (50 ml)

<u>6%</u>		<u>8%</u>		
24	g	24	g	Harnstoff (8M)
5,0	ml	5,0	ml	10 x TBE - S
7,5	ml	10,0	ml	38% Acrylamid/2% Bisacrylamid
ca.16	ml	ca.14,0	ml	H ₂ O
30	mg	30	mg	APS
20	µl	20	µl	TEMED

Der Harnstoff wurde nach der Zugabe von TBE, Acrylamidlg. und H₂O durch Erwärmen unter Rühren gelöst (Wasserbad nicht über 45°C, Harnstoff zersetzt sich), das Gemisch wurde auf 50 ml aufgefüllt (1,5 fache Volumenzunahme durch Harnstoff), auf Raumtemperatur abgekühlt und über einen Nalgene Filter (0,45 µm) filtriert und entgast.

Nach Start der Polymerisationsreduktion durch Zugabe von APS und TEMED wurde das Gel rasch gegossen. Eine der beiden Glasplatten war silikonisiert, um das Trennen der Gelplatten nach der Elektrophorese zu erleichtern. Das Gel wurde 15 min bis 1 h bei 1200 V, ca. 20 mA vorelektrophoretisiert (35 cm lange Glasplatten, 0,4 mm Spacer).

Die gefällten DNA-Proben wurden in Ladepuffer aufgenommen (80% Formamid, 1 mM EDTA, 0,05% BPB, 0,05 % XC), 3 min bei 90°C denaturiert, rasch in Eiswasser abgekühlt und sofort auf das Gel aufgetragen (Geltaschen vorher ausspülen wegen Harnstoff). Das Gel wurde bei 1800-2000 V (15-20 mA) in TBE-S elektrophoretisiert (1,5-3 h). Die Temperatur sollte dabei nicht 50°C übersteigen.

2.9.3 Autoradiographie

Zur Autoradiographie der Sequenzgele wurde ein X-Ray Film (Kodak XOMat AR) aufgelegt. Die Exposition erfolgte in Gegenwart einer Verstärkerfolie bei -80°C (1000 cpm (Cerenkov)/Bande sind nach 12 h gut sichtbar). Der Film wurde entwickelt und getrocknet. Zur Vermessung der Intensität der Banden mit dem Laserscanner (LKB) wurde eine Expositionsdauer gewählt, bei der die Schwärzung des Films noch proportional zur Signalstärke war.

2.10 DNA-Reinigung über Mikrostep-Gelfiltration und Dowex-Säulen

Mikrostep-Gelfiltration (Krieger and Tobler, 1977) wurde generell zum Abtrennen von Ionen und Nukleotiden von der DNA verwendet. Dazu wurde die Säule (Firma ABIMED) mit vorgequollenem Sephadex LH60 (in Te-Puffer) gefüllt und 4 min bei 2400 rpm zentrifugiert (Christzentrifuge). Nach Auftrage der Probe (max. 200 μl) wurde die Säule nochmals 4 min bei 2400 rpm zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde nach Ethanol-fällung in TE-Puffer aufbewahrt.

Dowex-Säulen

Dowex-Säulen wurden zur Abtrennung von EtBr-Resten in Plasmidpräparationen verwendet, die im vitro System als Templates eingesetzt wurden.

Zwei Spatelspitzen Dowex (1 x 8, Fluka Nr. 4450a) wurden in 100 ml Puffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 10 mM NaCl; 1 mM EDTA) aufgeschlemmt und das pH mit KOH auf 8.0 nachgestellt. Die Dowexperlen wurden in einer Fritte 2-3 mal gewaschen. Eine 5 ml Spritze wurde mit Glaswolle unten verstopft und die Dowex-Suspension eingefüllt. Die Probe wurde aufgetragen und mit 1-2 Säulenvolumen nachgewaschen. Die DNA eluiert schnell, sie bindet nicht an die Säule.

2.11 Alkalische Phosphatase-Behandlung (Maniatis, 1982)

Zur Markierung mit T4-Kinase wurden zuvor die 5' Phosphat-Enden der DNA-Fragmente dephosphoryliert. Vektor-DNA bei nicht gerichteten Klonierungen wurde ebenfalls mit Phosphatase behandelt. Die Reaktion wurde genau nach Maniatis (1982) durchgeführt, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm wurde verwendet (CIP), die durch Hitze und EGTA inaktivierbar ist. Nach 3 maliger Phenol-Extraktion wurden die Phosphatreste über Mikrostep-Gelfiltration von der DNA abgetrennt.

2.12 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

2.12.1 5' Endmarkierung mit T4-Kinase

Zur 5' Endmarkierung mit T4-Kinase wurde γ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP verwendet.

Standard-Reaktionsansatz: 2,5 μl 10 x Kinase Puffer
 100 μCi γ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP 3000 Ci/mMol
 7,5 μl DNA in TE (1 μg)
 10 u T4-Kinase

Das Volumen kann variiert werden. Zu beachten ist dabei, daß die γ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP-Konzentration im Ansatz $\approx 1 \mu\text{M}$ ist. PO_4^{3-} , NH_4^+ und RNA stören die Reaktion. Bei Markierung von Größenstandards (Gesamtverdau von Plasmid-DNA) muß die Plasmid-DNA vorher RNase behandelt sein. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, die Reaktion mit EDTA (5 mM final) abgestoppt. Nach Phenolextraktion wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit Mikrostep-Gelfiltration abgetrennt.

2.12.2 3'End-Markierung mit Klenow-Polymerase (Maniatis, 1982)

Zur Markierung der Hybridisierungsproben für das S1-Mapping muß mehr radioaktives α - $[^{32}\text{P}]$ -dNTP eingesetzt werden, als für normale Markierungen mit Klenow-Polymerase.

Standard-Reaktionsansatz (40 μl):

25	μl	α - $[^{32}\text{P}]$ -dNTP (250 μCi , 3000 Ci/mMol)
4	μl	10 x Klenow-Puffer
100	μM	(final) aller dNTPs außer dem markierten dNTP.
1	μg	DNA Fragment
5	u	Klenow-Polymerase

Inkubation erfolgte bei RT für 15 min. Zum vollständigen Auffüllen der Enden wurde die Konzentration des verwendeten α - $[^{32}\text{P}]$ -dNTPs durch Zugabe von kalter Stocklösung auf 2 nM eingestellt. Der Ansatz wurde noch weitere 5 min bei RT inkubiert, die Reaktion mit EDTA (5 mM final) abgestoppt. Nach Phenol-Extraktion wurden die Nukleotide durch Mikrostep-Gelfiltration abgetrennt.

2.13 Darstellung von Proteinen in SDS-Acrylamidgelen

Zur Analyse von Gesamtzellproteinen wurden 10%ige SDS/PA-Gele nach Lämmli (1970) verwendet. Das Sammelgel hatte eine Konzentration von 5% mit pH 6.8, das Trenngel war 10%ig mit pH 8.8. Zur Elektrophorese wird ein Tris-Glycin-SDS Puffer verwendet.

Die Proben (ganze Zellen 3×10^8 Z.) werden vor dem Auftragen in Proben-Puffer 5 min gekocht (0,0625 M Tris-HCl pH 6.8, 20% Sucrose, 5% Mercaptoäthanol, 1% SDS, 0,001% BPB).

Bis die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde mit 60 V elektrophoretisiert und die Spannung dann auf 150 V (max. 40 mA) erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Blau angefärbt (1-2 h, 50°C) und anschließend entfärbt.

2.14 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA für das S1-Mapping wurde in der Regel nach Brosius et al (1982) isoliert. "Hot-Phenol" Extraktionen (Aiba et al, 1981) führen zu einem hohen Anteil an chromosomaler DNA.

Nach Animpfen der Kultur (100 ml) wurden die Zellen inkubiert, bis sie eine optische Dichte von $OD_{550\text{ nm}} = 0.8$ hatten ($= 4-5 \times 10^8$ Zellen/ml). Sie wurden rasch auf Eis abgekühlt und mit 7000 rpm in einer Sorvalzentrifuge 5 min bei 2-4°C abzentrifugiert (SS34 Rotor). Die Zellen wurden in 3,1 ml Tris-HCl pH 7.9, 50 mM (0°C) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lysozym (5 mg/ml H₂O frisch angesetzt, 0°C) und 580 µl EDTA (250 mM pH 8.0, 0°C) wurden die Röhrchen mehrmals invertiert und 8 min in Eiswasser stehen lassen. Nach Zugabe von 1,5 ml Triton-Mix (0,3% v/v Triton X-100, 0,18 M EDTA pH 8.0, 0,15 M Tris-HCl pH 8.0, 0°C) wurden die Zellen weitere 8 min in Eiswasser stehen lassen (gelegentlich invertieren). Die Zelltrümmer wurden mit 12 000 rpm bei 2-4°C 20 min in einer Sorvallzentrifuge (SS34) abzentrifugiert. Der Überstand (nicht viskos) wurde 3mal mit Phenol|CHCl₃ (1:1) extrahiert. Dem Chloroform war Isoamylalkohol zugesetzt (25:1). Zum Trennen der Phasen wurden die Proben 5-10 min mit 15 000 rpm, 4°C in einer Sorvallzentrifuge (SS34 Rotor) zentrifugiert. Die organische Phase wurde bei der ersten Extraktion mit H₂O nachgewaschen. Die RNA wurde mit 2.5fachen Volumen Ethanol (0,3 M NaOAc pH 5.3), ausgefällt. Zur Fällung wurden Correx-Röhrchen verwendet (6 h bei 240°C gebacken). Das RNA-

Präzipitat wurde 30 min bei 2°C im HB4 Rotor (Sorvall) mit 9000 rpm abzentrifugiert und nach Trocknen in 1 ml H₂O aufgenommen. Nach Verteilung in Eppendorfröhrchen (autoklaviert) wurde die RNA-Lösung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Konzentration wurde durch OD-Messung bei 260 nm bestimmt. Ein Verhältnis $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 2.0$ zeigt eine saubere Präparation an (1 $OD_{260\text{ nm}} = 40\text{ }\mu\text{g RNA}$). Aus einer 100 ml Kultur wurden in der Regel 3-4 mg RNA isoliert.

Alle Lösungen wurden mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt (2 l H₂O + 2 ml Diäthylpyrokarbonat, 1 h Rühren, Autoklavieren). Die RNA wurde ebenfalls in DEPC behandeltem Wasser gelöst.

2.15 S1-Mapping (Berk and Sharp, 1978; Weaver and Weissmann, 1979)

Alle Lösungen wurden mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt (2.14); die Stammlösungen wurden in gebackenen Glasflaschen aufbewahrt (6 h, 240°C).

Puffer:

Denaturierungspuffer: 40 mM PIPES (NaOH) pH 6.3
 400 mM NaCl
 1 mM EDTA pH 6.5
 80% Formamid

5x Denaturierungspuffer: 200 mM PIPES (NaOH) pH 6.3
 2 M NaCl
 5 mM EDTA pH 6.5

Kurz vor Verwendung werden 4 Teile Formamid mit 1 Teil 5x Denaturierungspuffer gemischt.

Formamid: Das Formamid wird mit Biorad mixed bed Ionenaustauscher (AG 501-X8) deionisiert (ca. 5g mit 100 ml Formamid 5-10 min rühren, abfiltrieren). Das Formamid wird in Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

S1-Puffer:

280	mM NaCl
30	mM NaOAc pH 4.6
4,5	mM Zn(OAc) ₂
20	µg/ml Kalbsthymus DNA (CT, denaturiert)

Stop Mix:

2,5	M NH ₄ OAc
50	mM EDTA pH 8.0

10-200 µg Gesamt RNA wurden mit der Hybridisierungsprobe in 2,5 Vol. EtOH, 0,3 M NaOAc pH 5.3 gefällt. In der Regel wurden 25 000 cpm (Cerenkov) [³²P]-endmarkiertes DNA-Fragment (2-5 ng) zur S1-Analyse eingesetzt. Die DNA muß im molaren Überschuß zur spezifischen RNA sein. Die optimale RNA-Menge wurde experimentell ermittelt. Wenn eine niedrige RNA-Konzentration vorlag, wurde tRNA (E.coli) zugegeben. Das Präzipitāt wurde mit 70% EtOH gewaschen (2x, in der RNA-Präparation sind Phenolreste), und kurze Zeit getrocknet (extensives Trocknen erschwert die Lösung in Denaturierungspuffer).

Das Präzipitāt wurde in 30-50 µl Denaturierungspuffer sorgfältig gelöst. Die Eppendorfröhrchen wurden in Metallständern mit Metallklammern eingespannt und die Proben 10 min bei 85°C denaturiert. (Die Röhrchen müssen vollständig in Wasser sein, um Verdunstung zu vermeiden).

Nach der Denaturierung werden die Proben (rasch) in ein Wasserbad mit der gewünschten Hybridisierungstemperatur überführt (wiederum vollständig untergetaucht). Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach dem GC-Gehalt des Hybrids (s. Maniatis, 1982; Casey and Davidson, 1977), bzw. kann experimentell ermittelt werden.

z.B. 41% GC - 49°C

49% GC - 52°C

58% GC - 60°C

Die Hybridisierung wurde in der Regel über 3 h durchgeführt. Danach wurden die Röhrchen 20 im Wasser plziert, daß die Enden der Röhrchen im Wasser verblieben (Probenvolumen), sie dürfen nicht unter die Hybridisierungstemperatur abkühlen. Das 10fache Volumen an eiskaltem S1-Puffer wurde zugegeben (CT-DNA frisch denaturiert) und die Proben in Eiswasser gestellt. Nach Zugabe von S1 (die erforderliche Menge muß experimentell ermittelt werden) wurden die Proben 30 min bei 37°C inkubiert. (Bei hohem AT-Gehalt sind 20°C zum S1-Verdau empfohlen, sowie niedrigere Formamidkonzentration). Die Reaktion wird durch Zugabe von Stop-Mix beendet (0,5 M NH_4OAc , 10 mM EDTA final; zu 330 μl Ansatz wurden 75 μl Stop-Mix gegeben). Bei niedrigen RNA-Konzentrationen wurde tRNA als Trägermaterial (10-20 μg) zu den Proben gegeben. Die Nukleinsäuren wurden mit Propanol-2 gefällt (gleiches Volumen, über Nacht). Das Präzipitat wurde mit 95% EtOH gewaschen, kurz getrocknet und in 10 μl Ladepuffer (80% Formamid, 1 mM EDTA, 0,025% BPB, 0,025% XC) sorgfältig gelöst. 1/5 oder 1/2 Vol. des Ansatzes wurde meist zur Elektrophorese verwendet.

2.16 in vitro Replikation und Transkription

2.16.1 Extraktpräparationen

A. Rezipientenextrakte

2 l L-Medium (0,2% Glukose) wurden mit 20 ml einer Übernackkultur (WM433 = dnaA204; WM351 = dnaA5) angeimpft.

Während des Wachstums bis maximal 5×10^8 Zellen/ml bei 30°C wird das pH mit 5N KOH auf 8.0 nachgestellt, wenn erforderlich. Die Zellen wurden mit Eis rasch auf 0°C abgekühlt und in einem Sorvall GSA Rotor mit 7000 rpm, 10 min bei 2°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit Puffer 2 (s. Lösungen) gewaschen und in vorgewogene SS34 Röhrchen überführt. Nach Abzentrifugation der Zellen mit 10 000 rpm, 5 min bei 2°C im Sorvall SS34 Rotor wurde das Feuchtgewicht bestimmt (ca. 2 g Zellen/l Kultur). Die Zellen wurden in Puffer 2 resuspendiert (1 ml/g Feuchtgewicht), das Volumen gemessen und in TI50 Polykarbonatröhrchen überführt (nicht mehr als 7 ml/Röhrchen). Die Suspension wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. (Hier kann man unterbrechen.) Die gefrorene Suspension wurde über 10 bis 15 min bei 10°C aufgetaut. 1/50 Volumen einer Lysozym-lsg. (15 mg/ml in 50 mM EDTA pH 8.0) wurde zugegeben und nach Durchmischung 30 min bei 0°C inkubiert. Nach erneutem Einfrieren und Auftauen (s. oben) muß die Suspension viskos und bräunlich sein (ansonsten Wiederholung des Einfrierens und Auftauens). Die Zelltrümmer wurden 30 min bei 2°C mit 30 000 rpm im Beckmann TI50 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde

vorsichtig abgenommen und das Volumen gemessen. Gemörsertes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (enzymegrade) wurde langsam zugegeben (0,28 g/ml Ausgangsvolumen) und die Lösung weitere 20-30 min gerührt (im Eisbad, 0°C). Die ausgefällten Proteine wurden mit 17 000 rpm 20 min bei 2°C abzentrifugiert (Sorvall SS34 Rotor oder Beckmann TI50 Rotor) und in Puffer 1 resuspendiert (0,9 ml/g Feuchtgewicht). Der Extrakt wurde 45 min gegen $2 \times 0,5$ l Puffer dialysiert, in Eppendorfröhrchen verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

B. Donor-Extrakt (dnaA komplementierender Extrakt)

TC1430: Die Zellen wurden in Minimalmedium (008,2% Glyzerin, 0,15% Casaminoacides, 5 $\mu\text{g/ml}$ Thiamin, 20 $\mu\text{g/ml}$ Thymin) bis zu einer Zelldichte von 1,8 Z/ml bei 30°C kultiviert und anschließend 2 h bei 42°C inkubiert (4×10^8 Z/ml).

WM1151/pLSK5: Die Zellen wurden in L-Medium (37°C) bis auf eine Zelldichte von 7×10^7 Z/ml kultiviert und 3h mit 1mM IPTG induziert (4×10^8 Z/ml).

Die Aufarbeitung bis nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer ist wie in A.

Der Überstand wurde auf 0,3% Streptomycinsulfat eingestellt (30%ige w/v Stammlösung, in H_2O) und 30 min bei 0°C gerührt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden mit 20 000 rpm 20 min bei 2°C im Sorvall SS34 Rotor oder Beckmann TI 50 abzentrifugiert. Das Volumen des Überstandes wurde bestimmt und die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung wurde mit 0,25 g/ml Ausgangsvolumen durchgeführt. Die Proteinlösung wurde in 1 ml

Puffer 1 pro g Feuchtgewicht gelöst und ohne Dialyse sofort tiefgefroren (N_2).

Die Proteingehalte wurden nach Bradford (1976) bestimmt.

2.16.2 in vitro Replikations- und Transkriptions-Reaktion

Lösungen:

Puffer 1:	25	mM	Hepes-KOH pH 8.0
	100	mM	KCl
	1	mM	DTT

<u>Puffer 2:</u>	Puffer 1
+ 1	mM p-Aminobenzamidin
	(Sigma, Nr.A-7142)

<u>dNTP-Mix:</u>	400	μ l	Hepes KOH pH 8.0, 0,5 M
	110	μ l	Mg(OAc) ₂ , 1 M
	25	μ l	dATP
	25	μ l	dGTP
	25	μ l	dCTP
	25	μ l	dTTP
			} 10 mM (in 25 mM Hepes pH 8.0)
	25	μ l	NAD 10 mM (MW663.4)
	25	μ l	cAMP 10 mM (MW374.2)
	40	μ l	H ₂ O

<u>Energie-Mix:</u>	200	μ l	ATP 100 mM (in 25 mM Hepes pH 8.0)
	300	μ l	Kreatinphosphat (0,5 M in 25 mM Hepes pH 8.0)
	100	μ l	Kreatin-Kinase 10 mg/ml (25 mM Hepes pH 8.0, 100 mM KCl)

<u>rNTP-Mix:</u>	100	µl CTP 40 mM (in 25 mM Hepes KOH pH 8.0)	
	100	µl GTP 40 mM	
	100	µl GTP 40 mM	
<u>PEG 6000:</u>	50 %	in Puffer 1	
<u>Stop-Mix:</u>	0,5 %	SDS	
	5	mM Na-pyrophosphat	} pH 7.5
	0,5	mg/ml Kalbsthymus DNA	
10 % TCA:	5	mM Na-pyrophosphat	
5 % TCA:	5	mM Na-pyrophosphat	
2 % CH ₃ COOH			
[³ H]-dTTP:	1	mCi/ml	
	30-40	Ci/mol	
[³² P]-UTP:	410	Ci/Mol	
	1	mCi/ml	
<u>Reaktionsansatz:</u>	2,5	µl PEG (50 %)	
	1,75	µl dNTP-Mix	} Cocktail
	1,5	µl E-Mix	
	2,0	µl rNTP-Mix	
	1,0	µl [³ H]-dTTP	
	0,5	µl α[³² P]-UTP	
	X	µl Rezipientenextrakt	
	Y	µl Donorextrakt	
		mit Puffer 1 auf 25 µl auffüllen	

Anmerkungen: Alle Komponenten müssen optimiert werden im System, ebenfalls Extrakt- und DNA-Menge.

Wenn nur Replikation gemessen wurde, war kein α[³²P]-UTP im Cocktail. Der Cocktail wird entsprechend der Anzahl der Ansätze vorher gemischt.

Endkonzentrationen im Reaktionsansatz (25 μ l)
sind: 50 mM Hepes pH 8.0, 100 mM KCl, 11 mM Mg-
(OAc)₂, 15 mM Kreatinphosphat, 0,1 mg/ml Kreatin-
Kinase, 2 mM ATP, 0,4 mM CTP, GTP, α -[³²P]-UTP
(spez. Aktiv. 600 cpm/pMol), 0,05 mM NAD, 0,05 mM
cAMP, 0,025 mM dATP, dCTP, dGTP, [³H]-dTTP (spez.
Aktiv. 500 cpm/pMol und 5% PEG 6000(w/v)).

Als Template wurden pOC51 (90 ng) oder pBP8 (120
ng) DNA verwendet. Der Rezipientenextrakt war ent-
weder WM351 (dnaA5, 10,5 μ g/ml) oder WM433 (dnaA
204, 7 μ g/ μ l). Verschiedene Mengen an Donarextrakt
wurden dazugegeben (TC1430 oder WM1151/plSK5). Die
Ansätze wurden 60 min bei 30°C inkubiert, mit 200 μ l
Stop-Mix abgestoppt; nach Zugabe von 10% TCA (500 μ l)
wurden die Proben 10 min auf Eis präzipitiert und
über Sartorius Membranfilter (0,45 μ m) filtriert,
mit 5% TCA und 2% CH₃COOH gewaschen und getrocknet
(Rotlicht). Nach Zugabe des Szintillationsmixes
(NA, Beckmann) wurden die Proben im Szintillations-
zähler gemessen ([³H] und [³²P] parallel).

2.17 DNA-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert

Das einseitig 5'-[³²P]-markierte DNA-Fragment wurde nach
der Methode von Maxam und Gilbert (1980; Buhk, 1981) sequen-
ziert. Die lyophilisierten Proben nach den basenspezifi-
schen Hydrolysereaktionen wurden in 15 μ l Lade-Puffer (s.
denaturierende Sequenz-Gele) aufgenommen und im 8% Polyacryl-
amid-Harnstoff-Gel elektrophoretisiert (3 μ l).

3 ERGEBNISSE

3.1 Templateabhängiger Effekt des dnaA Proteins auf auf die in vitro Transkription und Replikation

Transkripte in der Originregion können als Primer RNA oder inhibitorische RNA in der Initiation eine Rolle spielen. Darüberhinaus kann Transkription auch die Funktion einer Originaktivierung übernehmen. Beim Phagen λ wird durch die Transkription im Replikationsorigin die Struktur so verändert, daß die Interaktion der Replikationsproteine O und P, sowie der Wirtsproteine dnaB und dnaG mit dem Origin ermöglicht wird (Lusky und Hobom, 1979). Die Regulation solcher Transkriptionsereignisse kann von zentraler Bedeutung für die Initiation sein.

Die Initiation an oriC ist abhängig von RNA-Polymerase und dnaA Protein (u.a.). Beide Proteine sind in einem sehr frühen Schnitt der Initiation involviert (Zyskind et al, 1977). In vitro konnten zwei kurze RNAs (ca. 110b) im Minimalorigin nachgewiesen werden, die ausgehend von den Promotoren p ori-l und p ori-r divergent transkribiert werden (Lothar and Messer, 1981). Die spezifische Bindung des dnaA Proteins an oriC DNA ist etabliert (Chakraborty et al, 1983; Fuller et al, 1983). Die Funktion der Transkription und auch des dnaA Proteins in der Initiation an oriC sind dabei jedoch unverstanden.

Auffälligerweise befinden sich manche der Bindungsstellen des dnaA Proteins in der Nähe der Promotoren p ori-r und p ori-l. Auch in direkter Nachbarschaft des 16kd Promotors ist eine solche Bindungsstelle vorhanden (distal; Fuller et al, 1984). Mehrere Indizien sprechen für eine Beteiligung der 16kd-Region an der Initiationskontrolle:

Die Transkription soll im Minimalorigin terminieren (Hansen et al, 1981); die 16kd Promotorregion trägt eine Inkompatibilitätsfunktion (incB, Stuitje and Meijer, 1983); die bidirektionale Replikation erfordert die Anwesenheit der 16kd-Region (Meijer and Messer, 1980); Minichromosomen mit 16kd-Region sind stabiler und haben eine höhere Kopiezahl (Huhle, 1984; Chakraborty, 1982).

Die Lokalisation der Bindungsstellen in der Nähe von Promotoren der oriC Region und die Suppression des dnaA(ts) Phänotyps durch RNA-Polymerasemutanten (Bagdasarian et al, 1977; Atlung, 1981; Schaus et al, 1981) lassen eine Wechselwirkung beider Proteine vermuten.

Um die Frage zu beantworten, ob das dnaA Protein, die für die Initiation benötigte Transkription beeinflusst, wurde das in vitro Komplementationssystem zur oriC Replikation verwendet. Dieses System wurde von Fuller et al (1981) entwickelt und beschrieben.

Dazu wird ein Proteinrohextrakt aus einer dnaA Mutante präpariert; in diesem Extrakt ist das dnaA Protein inaktiv (Rezipientenextrakt). Der komplementierende Extrakt wird aus einem Stamm, der ein dnaA überproduzierendes Plasmid enthält, präpariert (Donor-Extrakt). Die Präparation des komplementierenden Extraktes unterscheidet sich von der des Rezipientenextraktes. Durch eine (u.a.) etwas verschiedene Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei der Fällung der Zellproteine ist der komplementierende Extrakt alleine ebenfalls replikationsinaktiv. Erst durch Komplementation des Rezipientenextraktes (dnaA⁻) mit dem Donorextrakt (dnaA⁺) wird in Gegenwart eines oriC⁺-Plasmides als Template Replikationsaktivität erhalten. Gleichzeitig muß ein energielieferndes und -übertragendes System sowie die Bausteine zur RNA- und DNA-Synthese (rNTPs, dNTPs) angeboten werden.

Durch Verwendung entsprechender radioaktiv markierter Nukleotidtriphosphate kann man die Synthese von RNA und/oder DNA als Einbau in säureunlösliche Nukleinsäuren messen.

Der Rezipientenextrakt wurde aus einer dnaA5 Mutante (PC5, WM351) präpariert, der komplementierende Extrakt aus einem Stamm, der ein Plasmid mit induzierbarem dnaA-Gen enthält (TC1430, von T. Atlung zur Verfügung gestellt). Dieser Stamm trägt 2 Plasmide: auf einem Plasmid befindet sich das dnaA-Strukturgen hinter dem λP_L Promotor, auf dem zweiten kompatiblen Plasmid das Gen für ein temperatursensitives C_I Protein. Durch Inaktivierung des C_I -Repressors bei restriktiver Temperatur wird die P_L Transkription induziert (Der Stamm soll ca. 200x mehr dnaA Protein liefern als ein WT Stamm). Zur Untersuchung des möglichen Einflusses des dnaA Proteins auf die Transkription im Replikationsorigin wurden aufgrund der besonderen Merkmale der 16kd-Region, Minichromosomen mit und ohne 16kd-Region als Template im in vitro Komplementations-system verglichen. poc51 besteht nur aus chromosomaler DNA, es enthält die intakte 16kd-Region (Chakraborty, 1982). 2 PstI-Fragmente aus der Originregion sind zirkularisiert (2.2 kb nach links von der PstI-Schnittstelle im 16kd-Gen und 2.1 kb nach rechts; s. Abb. 1A). pBP8 dagegen trägt nur den Minimalorigin. Es ist ein Hybridplasmid aus dem B.subtilis Plasmid pPL603 und dem linken PstI-Fragment des poc51 (Ceglowski and Trautner, 1984); die oriC DNA ist im 16kd-Gen unterbrochen (s. Abb.1, Pos. 488).

Der Rezipientenextrakt (dnaA⁻) wurde zunächst auf Transkription optimiert und die erforderliche optimale DNA-Konzentration zur Replikation ermittelt. Transkription und Replikation wurden in der Komplementation gleichzeitig gemessen unter Verwendung von α -[³²P]-UTP bzw. [³H]-dTTP.

Abb. 2 stellt den Verlauf von Transkription und Replikation bei der Komplementation einer konstanten Menge Rezipientenextrakt mit steigenden Mengen an Donorextrakt (dnaA⁺) dar.

Der komplementierende Extrakt alleine hat keine nennenswerte Transkriptions- und Replikationsaktivität mit beiden Templates (Abb. 2a,c). Der Rezipientenextrakt alleine hat ebenfalls keine Replikationsaktivität, zeigt aber eine distinkte Transkriptionsaktivität (Abb. 2a, c).

Bei Verwendung von pOC51 als Template (mit 16kd-Region) ist bei niedriger komplementierender Konzentration an dnaA Protein (bzw. Extraktprotein) keine Replikation zu verzeichnen. Erst bei einer kritischen dnaA-Konzentration setzt Replikation ein. Bei genau dieser Konzentration weist die Transkriptionsaktivität ein Minimum auf (Abb. 16; noch 1/3 der Ausgangsaktivität). Transkription und Replikation durchlaufen bei weiterer Zugabe an komplementierendem Extrakt ein Optimum. Wird pBP8 als Template (ohne 16kd-Region) angeboten, ist diese kritische Konzentration an dnaA Protein nicht erforderlich. Replikation setzt bereits bei niedrigen Mengen an komplementierendem Extrakt ein. Die Transkriptionsaktivität wird allmählich reduziert und nivelliert sich auf einen konstanten Wert ein (Abb. 2c, ca. 3/4 der Ausgangsaktivität). Die optimale Menge an komplementierendem Extrakt ist für beide Templates gleich (1 μ l = 2,5 μ g Extraktprotein).

Die in vitro Replikation ist abhängig von dnaA, was auch für gereinigtes dnaA Protein beschrieben ist (Fuller and Kornberg, 1983). Die in vitro Transkription kann dagegen in Abwesenheit von dnaA Protein erfolgen. Sie wird jedoch beeinflusst von dnaA Protein und zwar verschieden, je nach verwendetem Template: Minichromosomen mit 16kd-Region scheinen zur Initiation der Replikation eine vorherige drastische Repression der Transkription zu erfordern, die durch niedrige Konzentration an dnaA Protein bewirkt wird.

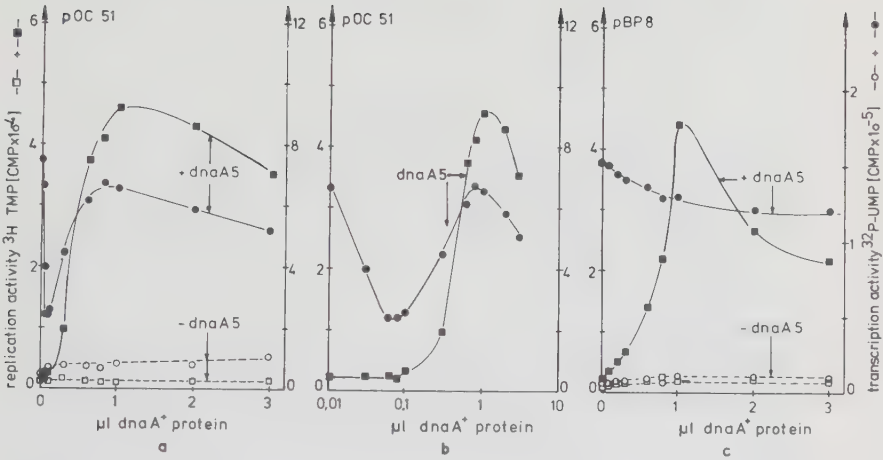


Abb. 2: Templateabhängiger Effekt auf die in vitro Transkription und Replikation

Transkriptionsaktivität (Kreise) und Replikationsaktivität (Quadrate) des dnaA5 Rezipientenextraktes (PC5, 1 µl = 10,5 µg Protein) sind als Funktion der Menge an komplementierendem dnaA Überproduzentenextrakt (TC1430, 1 µl = 2,5 µg Protein) dargestellt.

a + b: 90 ng pOC51 DNA wurden als Template verwendet. In b ist die komplementierende Extraktmenge logarithmisch aufgetragen. c: 120 ng pBP8 wurden als Template eingesetzt. Die offenen Symbole stellen die Transkriptions- und Replikationsaktivität des komplementierenden Extraktes alleine dar. Die Extraktpräparationen und der in vitro Assay sind im Methodenteil beschrieben.

Die Transkription von Minichromosomen mit Minimalorigin wird zwar etwas reduziert bei diesen Konzentrationen an dnaA Protein, die Initiation der Replikation ist aber nicht daran gekoppelt.

Damit ist zum ersten Mal nachgewiesen, welche Funktion das dnaA Protein in der Initiation der Replikation unter anderem hat: das dnaA Protein reprimiert Transkription im Replikationsorigin vor der Initiation der Replikation. Der Vergleich der beiden Minichromosomen im Komplementationssystem legt eine negative Kontrolle der 16kd Transkription durch das dnaA Protein nahe. Daraus würde zugleich folgen, daß die dnaA regulierte 16kd Transkription essentieller Bestandteil der Initiationskontrolle und somit des Replikationsorigin ist. Zusätzlich muß das dnaA Protein im Minimalorigin noch eine andere Funktion ausüben.

3.2 In vivo Transkription im Replikationsorigin

Das in vitro Replikationsexperiment zeigt, daß im Replikationsorigin dnaA regulierte Transkriptionsereignisse stattfinden. Initiation der Replikation findet nach starker, aber nicht vollständiger Repression vermutlich der 16kd Transkription statt; die Transkription nimmt mit dem Einsetzen der Replikation wieder zu. Dies kann eine wechselseitige Beeinflussung der Promotoraktivitäten im Minimalorigin, p ori-r, p ori-l, und der 16kd Promotoraktivität widerspiegeln.

Die Transkripte der beiden Originpromotoren p ori-r und p ori-l von ca. 110b waren bisher nur in vitro gezeigt worden (Lothar and Messer, 1981). Die in vivo Aktivität beider Promotoren konnte inzwischen durch Klonierung verschiedener Restriktionsfragmente der oriC Region

vor das Galaktokinasegen nachgewiesen werden. Galaktokinaseaktivität wird dabei als Indikator und Maß für Promotoraktivität benützt. Anhand desselben Systems wurden die Bereiche der Termination dieser Transkription festgelegt (Lother et al, in Vorbereitung). Nach diesen Daten sind es sehr schwache Promotoren. Transkription von p ori-r aus wird nach 110 b effizient terminiert. Transkription von p ori-l aus wird nicht effizient terminiert. Nach 108 b bzw. 115 b liegt ein Pausensignal für die RNA-Polymerase vor, das zu RNAs von 108 b bzw. 115 b Länge führt.

16kd Transkription- und Promotoraktivität war bisher ebenfalls nur anhand von Fusionsklonen mit galK und in vitro Transkription nachgewiesen worden (Lother et al, 1981; Lother et al, 1984; Hansen et al, 1981; Morita et al, 1981).

Um die Frage nach der Regulation dieser drei Transkripte (ori-r, ori-l, 16kd), ihrer möglichen Interaktion und Funktion bei der Initiation der Replikation zu untersuchen, war es zunächst notwendig, die Existenz der Transkription auf dem Chromosomen in vivo zu belegen.

Zum Nachweis und zur Charakterisierung von in vivo Transkripten ist das S1-Mapping die geeignetste und sensitivste Methode. Man kann damit in vivo Transkription von Promotoren in ihrer natürlichen Umgebung auf dem Chromosomen analysieren (Berk and Sharp, 1978; Weaver and Weissmann, 1979). Dazu wird Gesamt-RNA aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert. Das spezifische gesuchte Transkript wird gegen ein komplementäres radioaktiv endmarkiertes DNA-Fragment (probe) hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach dem GC-Gehalt des spezifischen RNA/DNA Hybrids. Bei Verdau mit einzelstrangspe-

zifischen DNA-Endonukleasen, wie S1- oder Mung-Bean-Nuklease, bleibt nur das komplementäre markierte DNA-Fragment im RNA-DNA-Hybrid geschützt. Das geschützte DNA-Fragment wird im denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoffgel elektrophoretisiert und durch Autoradiographie des Geles sichtbar gemacht. Durch Wahl geeigneter Fragment und Markierungsposition kann so die Existenz bzw. die genaue Start- und Terminationsposition von Transkripten nachgewiesen bzw. bestimmt werden.

Abb. 3 gibt eine Übersicht über die Lage der Promotoren im Replikationsorigin, wie sie anhand der beschriebenen Untersuchungen ermittelt wurden (inklusive Sequenzdaten, Buhk and Messer, 1983). Die zur S1-Analyse verwendeten Hybridisierungsproben sind ebenfalls angegeben.

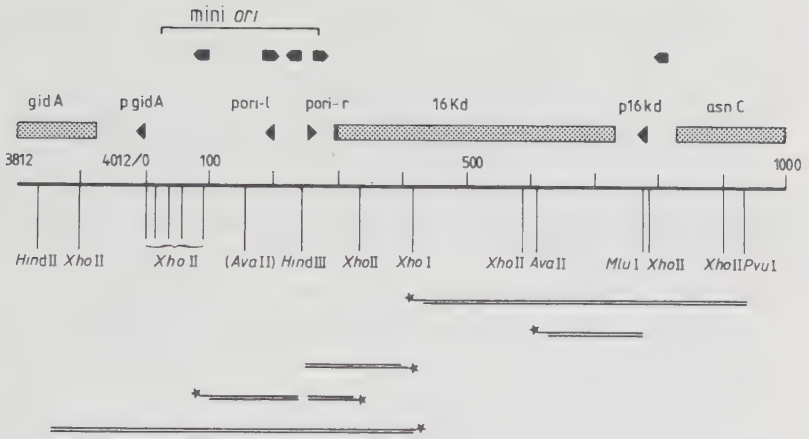


Abb. 3: S1-Mapping der Transkripte in der *oriC*-Region

Hybridisierungs- proben	markierter Strang (b)	Markierungs- position	Transkript
XhoI - PvuI (417-734)	519	418	16kd (5')
AvaII - MluI (619-777)	157	620	16kd (5')
HindIII - XhoI (244-417)	172	421	"ori-r(5')"
HindIII - XhoII (244-334)	89	338	"ori-r(5')"
XhoII - HindIII (92-244)	159	93	"ori-l(5')"
EcoRI - XhoI (3834-417) (HindII)	602	419	16kd(3')

Erläuterung: S. 56

Abb. 3: S1-Mapping der Transkripte in der oriC Region

Die 9bp Repeats sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die Richtung gibt die Orientierung der Konsensus-Sequenz 5'-TTAT^CCA^AA-3' an. Lage der Promotoren und Gene sind eingezeichnet, die Spitze der schwarzen Dreiecke gibt die Transkriptionsrichtungen an. Die zur Isolierung der Fragmente relevanten Restriktionsstellen sind eingezeichnet (Koordinaten von pCM959). Die DNA-Fragmente wurden aus pOC82 isoliert (HindII-Fragment (3834-1495), mit EcoRI-linkern in pBR325; N. Foulaki, unveröffentlicht).

Markierung und Isolierung der einseitig endmarkierten Proben ist im Methodenteil beschrieben.

3.2.1 5'Ende des 16kd Transkriptes

Die Startposition des 16kd-Transkriptes wurde auf dem Chromosom und Minichromosom pCM959 ermittelt. pCM959 ist ein Minichromosom, das nur aus chromosomaler DNA besteht (Abb. 1 A); zur Selektion wird das asnA-Gen benutzt (Meyenburg et al, 1979; Buhk, 1982). pCM959 ist eines der stabilsten Minichromosomen, es liegt in 10 Kopien pro Chromosomenäquivalent vor (Chakraborty, 1982). Der Vergleich sollte zeigen, ob Unterschiede in der 16kd Transkription auf dem Chromosom und Minichromosom bestehen und ob die unterschiedliche Gendosis des 16kd-Gens in der Transkriptmenge reflektiert wird.

Gesamt-RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen von WM648 und WM647 (WM648 + pCM959) isoliert. WM648 ist ein recA Stamm, der aufgrund seines asn-Markers üblicherweise zur Selektion von pCM959 haltigen Zellen verwendet wird.

Zur Kartierung des 5'Endes des 16kd Transkriptes von pCM959 wurde das 5'- $[^{32}\text{P}]$ -XhoI - PvuI Fragment zur Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus WM647 eingesetzt (Abb. 3). Das Prinzip des S1-Mappings ist im vorangehenden Kapitel erläutert, die genaue Durchführung der RNA-Isolierung und des S1-Mappings ist im Methodenteil beschrieben.

Nach Verdau mit S1-Nuklease bleiben zwei DNA-Fragmente mit einer Länge von 335 ± 5 b bzw. 340 ± 5 b erhalten (Abb. 4 A). Die entsprechenden Transkriptstarts auf dem Minichromosom pCM959 sind die Positionen 753 ± 5 bzw. 758 ± 5 (s. Abb. 6).

Die beiden Positionen liegen sehr nah benachbart. Um Artefakte als Folge des S1-Verdaus auszuschließen, wurde

die Inkubation nach der Hybridisierung mit verschiedenen Mengen S1-Nuklease durchgeführt. Parallel dazu wurde auch Mung Bean-Nuklease verwendet. Diese Nuklease ist spezifischer für einzelsträngige DNA als S1-Nuklease (Kowalski et al, 1976; Kroeker and Kowalski, 1978); sie zeigt jedoch eine ausgeprägtere Sequenzspezifität (Kowalski and Sanford, 1982).

In diesem Experiment wurde das kürzere 5'- $[^{32}\text{P}]$ -AvaII-MluI Fragment als Hybridisierungsprobe verwendet (Abb. 3).

Die Enzymkinetik zeigt, daß die zweite kürzere Bande durch einen Überschuß an S1-Enzym entsteht (Abb. 4 B, 4, 5). Die mit diesem Fragment ermittelten Startpositionen 757 ± 3 b und 749 ± 3 b stimmen gut überein mit dem Ergebnis anhand des *XhoI - PvuI - Fragmentes.

Nach S1-Verdau mit 100 u im Ansatz bleibt ein 137 b Fragment geschützt, mit 300 u S1 im Ansatz hauptsächlich ein 129 b Fragment. Im Ansatz mit Mung Bean-Nuklease sind 6 Banden unterschiedlicher Intensität sichtbar (Abb. 4 B, 7, 8). Bei Erhöhung der Enzymmenge bleibt das Bandenmuster erhalten, mit Ausnahme des längsten Fragmentes. Zwei davon stimmen mit den beiden S1-geschützten Fragmenten überein.

Zur Umgehung der Fehler in der Längenmessung wurde das 5'- $[^{32}\text{P}]$ -AvaII - MluI Fragment sequenziert (Maxam and Gilbert, 1980). Das längere S1-geschützte Fragment entspricht der Startposition 757 (Abb. 5, d), das kürzere der Position 749 auf dem Sequenzgel.

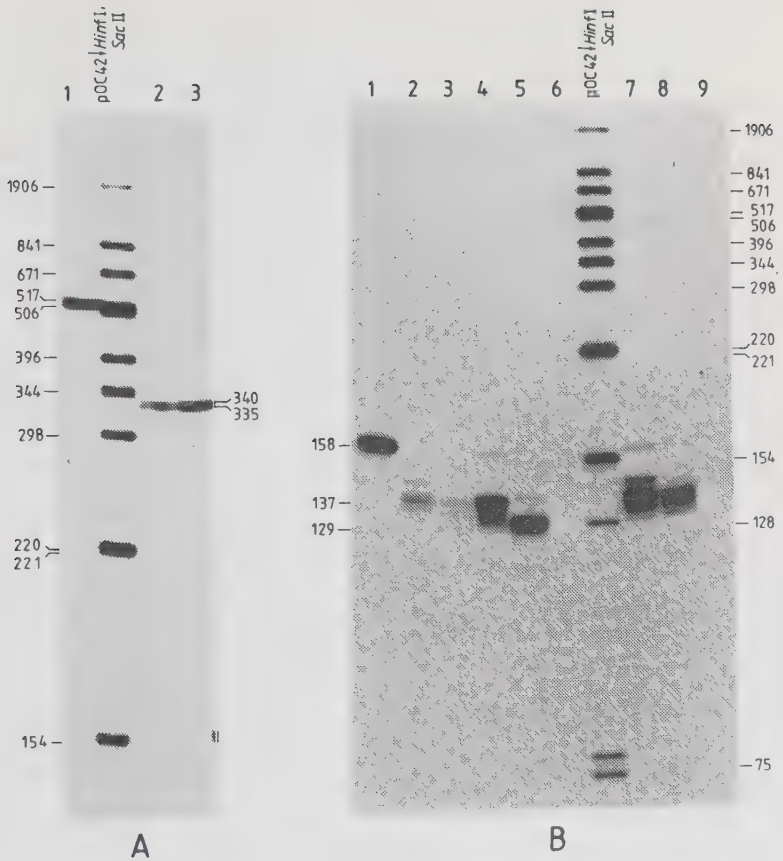


Abb. 4: Kartierung des 5'Endes des 16kd Transkriptes (in vivo)

- A: 16kd Transkript vom Minichromosom pCM959. Die RNA (WM647) wurde mit 25 000 cpm $5' [^{32}P]$ -XhoI-PvuI Fragment (Abb. 3) in 50 μ l Denat. Puffer hybridisiert (3 h, 54°C); in 500 μ l S1-Puffer mit 200 u S1 verdaut (30 min, 37°C). Gleiche Mengen wurden in 8% PA/Harnstoff-Gel elektrophoretisiert. Autoradiogramm: 15 h.
- 1) $[^{32}P]$ -XhoI-PvuI Fragment
 2) 75 μ g RNA, 3) 150 μ g RNA

B: Vergleich Chromosom/pCM959; S1- bzw. Mung Bean Kinetik

150 µg RNA wurden mit 25 000 cpm 5'-[³²P]-AvaII - MluI Fragment in 30 µl Denat. Puffer hybridisiert (3 h, 55°C) in 300 µl S1-Puffer mit S1- bzw. Mung Bean Nuklease verdaut (30 min, 37°C).

- 1) 5'-[³²P]-AvaII - MluI Fragment;
- 2) WM648; 100 u MB;
- 3) WM648; 100 u S1;
- 4) WM647; 100 u S1;
- 5) WM647, 300 u S1;
- 6) tRNA, 100 u S1;
- 7) WM647; 100 u MB;
- 8) WM647, 300 u MB;
- 9) tRNA, 100 u MB.

Elektrophorese wie in A. Autoradiogramm: 20 h

Größenstandard: pOC42 (Messer et al, 1978) mit HinfI/
SacII geschnitten.

MB = Mung Bean-Nuklease

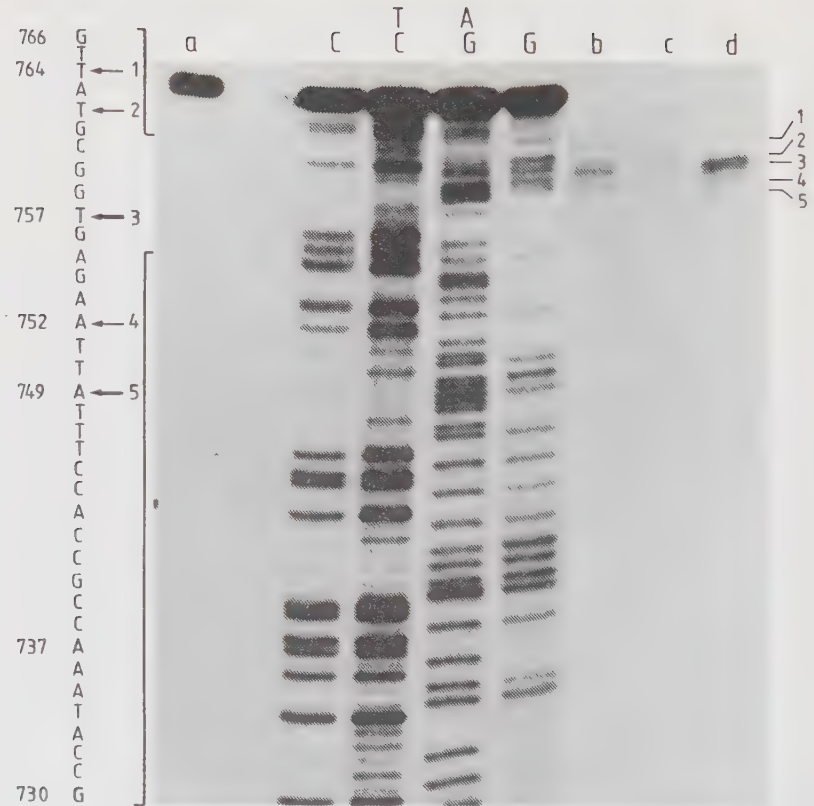


Abb. 5: Startposition des 16kd Transkriptes

Die Hybridisierungsprobe des 5'- $[^{32}\text{P}]$ -AvaII - MluI Fragments wurde nach Maxam-Gilbert sequenziert. Auf dem 8% Harnstoff/Polyacrylamidgel sind die S1 bzw. MB geschützten Fragmente (Ansätze aus 4 B) aufgetragen. a) AvaII - MluI Fragment, b) WM647, 100 μ MB, c) WM648, 100 μ MB, d) WM647, 100 μ S1.

Der Ausschnitt der Sequenz (Pos. 766-730) ist links außen angegeben. Die mit 1-5 nummerierten Pfeile entsprechen den Banden nach MB-Verdau; die hervorgehobenen Pfeile 3 und 5 entsprechen den Banden nach S1-Verdau (100 μ bzw. 300 μ). Autoradiogramm: 15 h (Sequenzteil 2 Tage).

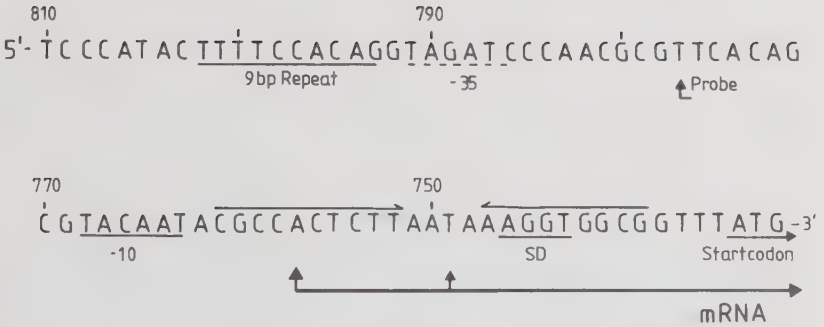


Abb. 6: Sequenz der 16kd Promotorregion (Buhk and Messer, 1983)

Die -10 und -35 Region, ribosomale Bindungsstelle (SD) und dnaA Bindungsstelle (9bp Repeat) sind unterstrichen. Das Ende der Hybridisierungsprobe [³²P]-AvaII-MluI (markierter Strang) ist angegeben. Die invertiert repetitive Sequenz ist durch Pfeile über der Sequenz gekennzeichnet. Die mit S1-Mapping ermittelte Startposition ist mit vertikalem Pfeil markiert (Pos. 757), die auftretende zweite Bande mit dünnem Pfeil (Pos. 749). Die Koordinaten sind bezogen auf pCM959.

Die geschützten DNA-Fragmente (1-5) nach Mung Bean-Nuklease Verdau entsprechen einem A oder T in der DNA-Sequenz (Abb. 5 b). Von dem Enzym ist eine Präferenz für die Erkennung von A bzw. T im Einzelstrang beschrieben (Kowalski and Sanford, 1982); die Vielzahl der Banden wurde daher als Konsequenz dieser Basenspezifität der Mung Bean-Nuklease bewertet.

Aufgrund der Sequenz des 5'Endes des 16kd Gens kann man die Entstehung der beiden S1-geschützten Fragmente erklären. Die Region um die Position 750 ist relativ AT-reich (Abb. 6). Die Hybridisierungstemperatur im Experiment entspricht dem GC-Gehalt des Gesamtfragmentes bzw. Hybrids. Das 5'Ende des RNA/DNA Hybrids ist bei dieser Temperatur weniger stabil und kann bei erhöhter Enzymmenge abgespalten werden und zu einem scheinbar verkürzten Transkriptstart führen. Zudem ist um die Position 750 eine invertiert repetitive Sequenz vorhanden, die bei unvollständiger Hybridisierung aufgrund des hohen AT-Gehaltes in diesem Bereich die Ausbildung einer Haarnadelstruktur in dem DNA-Fragment ermöglicht. In dieser Haarnadelstruktur ist der Bereich direkt bei der Position 750 als Einzelstrang-DNA exponiert (im "loop") und kann folglich durch S1 gespalten werden.

Diese Struktur könnte auch im 16kd Transkript in vivo vorliegen, was wichtig sein mag für die Regulation der Expression des 16kd Proteins. Die ribosomale Bindungsstelle liegt im gepaarten Teil der Haarnadelstruktur; eine solche Transkriptstruktur ist inaktiv in der Translation. Sekundärstrukturen in der RNA sind auch von Bedeutung für die Interaktion von komplementären RNAs (Tomizawa et al, 1982; Mizuno et al, 1984).

Als richtiger Startpunkt des 16kd Transkriptes wird daher das A in Position 757 erachtet (Abb. 6). Anhand der in vitro Transkriptanalyse wurde dieselbe Startposition ermittelt (Lother et al, 1981).

Die S1-Kartierung des 5'Endes des chromosomalen 16kd-Transkriptes mit RNA, die aus WM648 isoliert wurde, ergibt denselben Startpunkt (Abb. 4,1 und 2; Abb. 5, b und c). Die 16kd Transkription auf dem Chromosom und Minichromosom pCM959 unterscheidet sich qualitativ nicht.

Zum Vergleich der relativen 16kd Transkriptmengen von Chromosom und Minichromosom pCM959 wurde RNA aus verschiedenen Stämmen mit S1-Mapping analysiert. Die 16kd Transkriptmenge aus einem Wildtypstamm, der ein Plasmid mit dem dam-Methylasegen enthält (WM1332) und aus der dnaA 508 Mutanten bei permissiver Temperatur (WM1140, 30°C) wurde mit der Transkriptmenge aus pCM959 haltigen Zellen verglichen (Abb. 7, Tab. 2). Die anderen vergleichenden Analysen, die in dieser Abbildung dargestellt sind, werden anderer Stelle diskutiert: 16kd Transkription in dnaA Mutanten (WM1140, 30°C und 42°C) wird in 3.3.1 behandelt; der Einfluß der dam-Methylierung auf die 16kd-Promotoraktivität wird in 3.4.3 erörtert.

Für die relativen Quantifizierungen wurde zuvor durch Hybridisierung mit steigenden Mengen RNA und konstanter Menge an Hybridisierungsprobe die RNA-Konzentration ermittelt, bei der noch lineare Zunahme des Signals zu verzeichnen war. Die RNA-Präparationen wurden auf Agarosegelen kontrolliert; der DNA-Anteil ist reproduzierbar und vernachlässigbar klein. Es kann davon ausgegangen werden, daß die relative Quantifizierung nicht durch kompetitierende DNA in den RNA-Präparationen verfälscht wird.

Nach der Intensitätsmessung der Banden auf dem Autoradiogramm (Abb. 7, a,c,e) ist in pCM959 haltigen Zellen 5-6 mal mehr 16kd Transkript vorhanden (Tab. 1). Dies entspricht der Erwartung aufgrund der Kopiezahl (Kopien pro Chromosomenäquivalent) von pCM959. In Zellen, die mit einer Generationszeit ≈ 1 h wachsen, ist die Replikation bereits neu initiiert, d.h. alle Chromosomen enthalten 2 Kopien der Origin-Region. Das gemessene Verhältnis von chromosomalen und plasmidkodiertem Transkript entspricht also dem Verhältnis der 16kd Gen-Kopien.

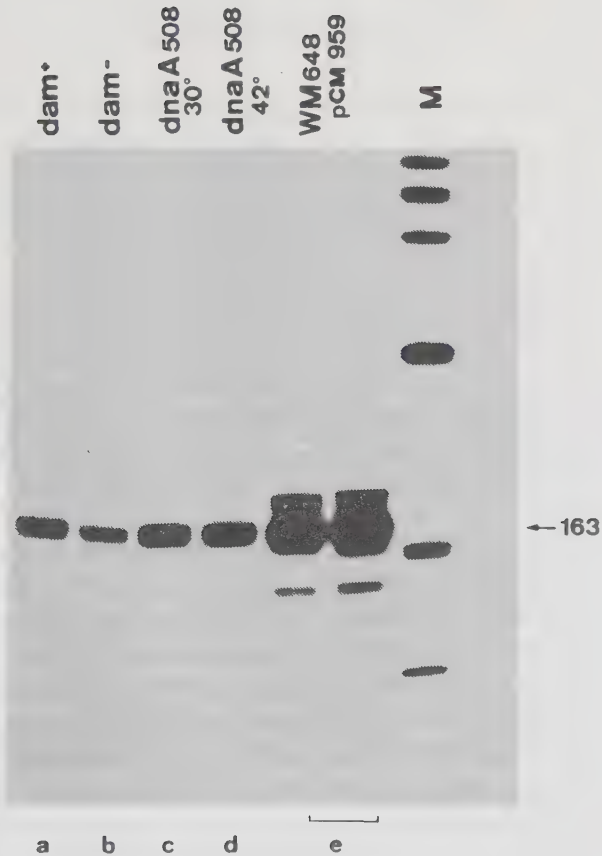


Abb. 7: Vergleich der relativen Transkriptmenge von Chromosom und Minichromosom pCM959

150 µg RNA wurde mit 30 000 cpm 5'-[³²P]-XhoII-MluI Fragment (Pos. 587-777, Abb. 3) in 50 µl Denat. Puffer hybridisiert (3 h, 54°C) und in 500 µl (S1-Puffer mit 150 u S1 Nuklease verdaut (30 min, 37°C). Gleiche Mengen wurden im 8% PA/Harnstoff-Gel elektrophoretisiert. Autoradiogramm: 18 h

a) WM1332 (pdam⁺), b) WM1091 (dam⁻), c) WM 1140, 30°C, d) WM1140, 42°C, e) WM647, 2 verschiedene Präparationen zu dam⁺/dam⁻ siehe 3.4, zu WM1140 30°C/42°C siehe 3.3

Tabelle 1: Relative Quantifizierung des 16kd Transkriptes von Chromosom und pCM959 (Abb. 7)

RNA	W647 pCM959	WM1440 30° (dnaA508)	WM647 (pCM959)	WM1332 (pdam ⁺)
Peak fläche (mg)	10.1	2.17	10.1	1.7
normier- te Werte	4.7	1.0	5.9	1.0

Die Intensität der Banden auf dem Autoradiogramm wurde mit einem Lazerscanner (LKB) vermessen, die Peakfläche ausgeschnitten und gewogen. Zum Vergleich wurde jeweils auf den minichromosomenfreien Stamm normiert (WM1140, 30°C bzw. WM1332).

In Abb. 5 (3,4) wurde ein Unterschied der chromosomalen und plasmidkodierten 16kd-Transkription mit einem Faktor 9.5 gemessen. In diesem Fall wuchs die Kultur von WM648 bedingt durch ärmeres Medium mit einer Verdopplungszeit von 150 min. Vermutlich entspricht auch in diesem Fall das Verhältnis der Transkript-Mengen dem Verhältnis der Gen-Kopien. Jedoch liegen genaue Messungen der Kopiezahl bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen nicht vor.

3.2.2 Termination der 16 Kd Transkription

Die 16 Kd Transkription beeinflusst die Initiation der Replikation (3.1). Um einen Hinweis zu erhalten, was die molekulare Basis davon ist, sollte auch das genaue Transkriptende bestimmt werden.

In dieser S1-Kartierung wurde das HindII-XhoI-Fragment verwendet, das am 3'Ende an der XhoI-site markiert war. (Die HindII-site ist durch die Konstruktion des pOC82 eine EcoRI-site, s. Abb. 3.)

Das Ergebnis dieser S1-Analyse war überraschend. 16 Kd Transkription kann den gesamten Replikationsorigin durchlaufen. Dies gilt für die 16 Kd Transkription auf dem Minichromosom pCM959 (Abb. 8) und auf dem Chromosom (Abb. 11A, WT RNA). Der Hauptanteil der 16 Kd Transkription wird nicht terminiert, ungefähr 60 % der geschützten DNA (Radioaktivität) entspricht der Länge der eingesetzten Hybridisierungsprobe. Daneben treten eine Reihe von kürzeren DNA Fragmenten auf, die auch bei steigenden S1-Mengen erhalten bleiben (Abb. 8A). Diese kürzeren Transkripte können nur auf Termination der RNA-Polymerase oder Prozessieren des 16 Kd Transkriptes zurückzuführen sein. Durch die spätere Analyse der 16 Kd Transkription in RNase H Mutanten wird gezeigt, daß diese kürzeren Transkripte Prozessierungsprodukte sind (3.3.3).

Die Temperaturvariationen um 1° C im Bereich der dem GC-Gehalt des gesamten Fragmentes entsprechenden Hybridisierungstemperatur (50°C) führen zu Veränderungen der Anzahl und Längen der geschützten kürzeren DNA Fragmente (Abb. 8B). Der Grund dafür liegt in dem unterschiedlichen GC-Gehalt bzw. Stabilität der verschieden langen RNA/DNA Hybride.

Eine Anmerkung zu den Kontrollversuchen ist nötig. Der Anteil an renaturierter DNA, der mit jeder doppelsträngigen Hybridisierungsprobe beim S1-Mapping vorkommt, ist bei diesem RI-XhoI*-Fragment S1-resistenter. Das markierte Nukleotid ist 3 Basen vom Ende des ds Moleküls entfernt ("fill in"-Reaktion). Dies führte in manchen Experimenten zu einem unüblich höheren Anteil an unverdauter DNA im Kontrollansatz mit unspezifischer RNA (i. Vgl. zu "probes" mit überstehenden Enden). Es werden jedoch immer gleiche Mengen an Hybridisierungsprobe für die Ansätze verwendet. Die Differenz der Menge an geschützter DNA nach S1-Verdau entspricht folglich spezifischem RNA/DNA Hybrid. Unvollständig verdaute DNA im Kontrollansatz weist nie das typische Bandenmuster auf (z. B. Abb. 8, B, 4, Abb. 12, e, g).

In Abb. 9 ist das Ergebnis der 3'Endanalyse schematisch dargestellt. Nur die Banden, die bei 50°C prominenter und reproduzierbar auftraten, wurden ausgewählt. (Abb. 8, 1-7 = Abb. 9, 1-7). Es gibt eine auffällige Übereinstimmung mit einer der beiden RNA-DNA Transitionsstellen, die Okazaki et al (1980, Hirose et al 1983) im Replikationsorigin identifiziert haben (Pos. 107 $\pm$ 5 Nr. 4). Die Transitionsstellen liegen auf dem Strang mit 5'-3'-Polarität im Gegenuhrzeigersinn. Nur auf diesem Strang konnten bisher DNA-Inzeptionsstellen nachgewiesen werden.

Der Bereich, in dem Termination des pori-1 Transkriptes erfolgt (M. Schauzu, pers. Mitteilung) entspricht einer der beiden stärker vertretenen RNAs in der S1-Analyse (Pos. 37 $\pm$ 10, Nr. 3).

Das kleinste S1-geschützte Fragment entspricht einem Terminationsprodukt am Ende des 16 Kd Gens (Pos. 287 $\pm$ 5, Nr. 7).

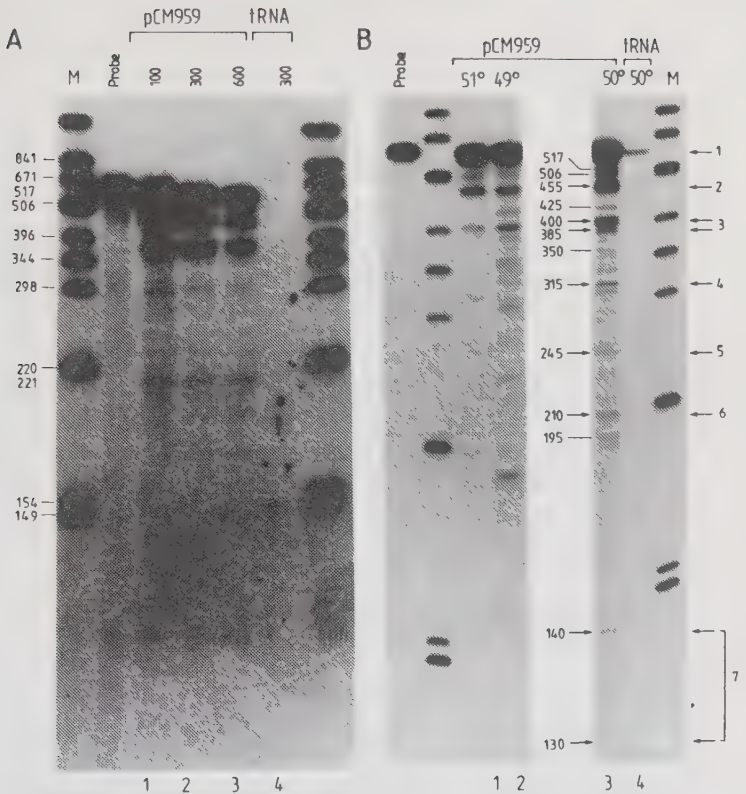


Abb. 8: S1-Kartierung des 3'Endes des 16 Kd Transkriptes

A. S1-Kinetik

75 µg RNA (WM 647, pCM959) wurden mit 25000 cpm RI-XhoI-³²P-3' Fragment (Abb. 3) in 30 µl Denat. Puffer hybridisiert (3h, 50°C) und in 300 µl S1-Puffer mit 100 u (1), 300 u (2), 600 u (3) S1 verdaut (30 min, 37°C). Gleiche Mengen wurden in 8 % PA/Harnstoff Gel elektrophoretisiert. Autoradiogramm: 4 Tage

B. Temperaturvariation

150 µg RNA (WM 647) wurden mit demselben Fragment in 50 µl Denat. Puffer bei 49°C (2), 50°C (3), 51°C (1) mit 200u S1 verdaut. Gleiche Mengen zur Elektrophorese in 8 % PA/Harnstoff Gel verwendet. Autoradiogramm: 2 Tage
Die Pfeile 1 - 7 zeigen die Banden an, deren entsprechende Transkriptlänge in Abb. 9 schematisiert dargestellt ist.

Die Bedeutung dieser Übereinstimmungen wird im Zusammenhang mit der Kontrolle der 16 Kd Transkription diskutiert (4).

Die wichtigste Aussage dieses S1-Mappings ist: 16 Kd Transkription wird nicht effektiv terminiert im Replikationsorigin.

Anhand der Klonierung verschiedener Restriktionsfragmente aus der oriC Region vor das tet-Gen und dem Vergleich der Resistenzniveaus war effektive Terminierung der 16 Kd Transkription im Minimalorigin abgeleitet worden (Hansen et al, 1981; Morita et al, 1981). Das Ergebnis von Hansen et al (1981) wurde mittlerweile als Klonierungsartefakt verworfen; Arbeiten aus derselben Gruppe haben das Durchlesen der 16 Kd Transkription durch oriC bestätigt (Meyenburg et al, 1984).

Transkripte im Minimalorigin

Die in vivo Transkripte der beiden Originpromotoren, pori-r und pori-l, konnten mit dem S1-Mapping nicht nachgewiesen werden. Es gibt jedoch genügend Evidenz für ihre Existenz (s. 3.2). Daher kommen nur die zwei folgenden Gründe für das negative Ergebnis in Frage:

1. Eine zu geringe Konzentration des RNAs kann vorliegen, um mit dem S1-Mapping noch erfaßt zu werden (bei Gesamt-RNA sind 10 - 20 Moleküle/Zelle die untere Nachweisgrenze).
2. Die ausgeprägte Sekundärstruktur und der gleichzeitig hohe AT-Gehalt der Origin-DNA kann extreme Instabilität und S1-Sensitivität der RNA/DNA Hybride bewirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher im weiteren die Regulation und Funktion der 16 Kd Transkription bei der Initiation untersucht.

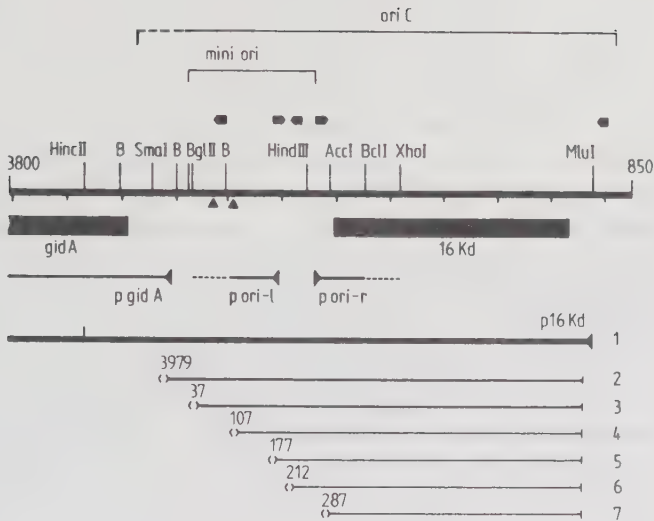


Abb.9: 16 Kd Transkription durch den Replikationsorigin

Die *oriC*-Region mit *dnaA* Bindungsstellen (schwarze Pfeile), *gidA*, 16 Kd Gen und einigen relevanten Restriktionsschnittstellen ist abgebildet. Die Transkripte der Originpromotoren sind eingezeichnet (schwarze Balken; Promotoren und Transkriptionsrichtung werden durch Dreiecke gekennzeichnet); der gestrichelte Teil kennzeichnet die Terminationsregionen für *Pori-l* und *Pori-r* (Lothar et al, in Vorbereitung). Die Transkripte mit den Nummern 1 - 7 entsprechen den prominenten und reproduzierbaren S1 geschützten Fragmenten der 3' Kartierung des 16 Kd Transkripts bei 30°C; Probe: EcoRI(HindII)-XhoI-[³²P]-3' Fragment. Die Zahlen am linken Ende geben die Terminationsposition an, die Klammern stehen für die Ungenauigkeit der Längenmessung. 1: Hauptbande; 2+3: relativ prominente Banden; 4-7: Minoritätsbanden. Die beiden aufrechten Dreiecke markieren die DNA-Inzeptionsstellen nach Okazaki et al (1980).

3.3 Regulation der 16 Kd Transkription

Suppression des dnaA (ts) Phänotyps durch RNA-Polymerase Mutanten ließen eine Interaktion beider Proteine vermuten (Bagdasarian et al, 1977; Atlung, 1981; Schaus et al, 1981). Nahe der -35 Region des 16 Kd Promotors befindet sich eine Bindungsstelle des dnaA Proteins (9bpRepeat, Abb. 6, Fuller et al, 1984). Im in vitro Replikationssystem erfolgt vor der Initiation eine dnaA abhängige Repression der Transkription, aber nur wenn Minichromosomen mit 16 Kd-Region als Template verwendet werden (3.1). In vivo durchläuft die 16 Kd Transkription großenteils den Replikationsorigin und könnte dabei die Initiation der Replikation hemmen (3.2.2). Diese Befunde führten zu dem Postulat einer dnaA regulierten 16 Kd Transkription.

Die negative Regulation der 16 Kd Transkription durch das dnaA Protein konnte von unserer Gruppe im galK-System gezeigt werden (Lothar et al, 1984). Die 16 Kd Promotorregion war dazu vor das Galaktokinase-Gen kloniert worden. In dnaA Mutanten steigt die 16 Kd Promoteraktivität (galK-Aktivität) bei restriktiver Temperatur spezifisch an. In einem gekoppelten in vitro Transkriptions-Translationssystem wird die 16 Kd Promoteraktivität durch Zugabe von dnaA Extraktprotein fast vollständig reprimiert. Im Vergleich mit anderen in gleicher Weise klonierten Promotoren ist der 16 Kd Promotor ein sehr starker Promotor.

In dieser Arbeit wird die Regulation der 16 Kd Transkription auf dem Chromosom in vivo untersucht. Das S1-Mapping erschien dafür die geeignete Technik zu sein: Die S1-Analyse des 16 Kd Transkriptes von Chromosom und Minichromosom hatte Unterschiede entsprechend der Anzahl der 16 Kd Genkopien wiedergegeben. Zur Bestimmung der Halbwertszeit von einigen mRNAs in Bakterien und die Re-

gulation ihrer Stabilität in Abhängigkeit von der Wachstumsphase war das Sl-Mapping schon erfolgreich verwendet worden (Gabain et al, 1983; Gabain et al, 1984).

3.3.1 16 Kd Transkription in dnaA Mutanten

Bei negativ regulierter 16 Kd Transkription durch das dnaA Protein, muß die Transkription in dnaA Mutanten bei nicht permissiver Temperatur dereprimiert sein. Daher wurde RNA aus der dnaA 46 Mutanten (EC558), dem isogenen Wildtypstamm (EC559) und der dnaA 508 Mutanten (WM1140) isoliert. Die Zellen wurden dazu bis in die exponentielle Wachstumsphase bei permissiver Temperatur (30°C) kultiviert und ein Teil der Kultur für 30 min oder 60 min bei restriktiver Temperatur (42°C) inkubiert.

In der Sl-Analyse der 16 Kd Transkription war ein deutlicher, aber geringer Derepressionseffekt zu beobachten. Das Signal für die 16 Kd Transkription erhöhte sich nach Inaktivierung des dnaA Proteins um einen Faktor 1.1 bis 1.5 (s. z. B. Abb. 7, c + d; Faktor 1.3 Unterschied zwischen 30°C und 42°C). Die Kontrolle im Wildtyp zeigte immer eine geringe Abnahme der 16 Kd Transkriptmenge als Folge der Temperaturerhöhung (Faktor 0.9 - 0.8). Mit Berücksichtigung der Temperaturkontrolle entspricht dies einer Zunahme der 16 Kd Transkription um einen Faktor 1.2 bis 1.7 in dnaA Mutanten bei restriktiver Temperatur.

Die 16 Kd Transkription ist demnach auch auf dem Chromosom negativ durch das dnaA Protein reguliert.

3.3.2 16 Kd Transkription nach Induktion des dnaA Proteins

Zur Absicherung und Bestätigung wurde das umgekehrte Experiment gewählt: in Gegenwart eines Plasmids, auf dem ein induzierbares dnaA Gen kloniert ist, mußte die chromosomale 16 Kd Transkription nach Induktion des dnaA Proteins reprimiert werden.

In dem Stamm, der zur in vitro Komplementation verwendet wurde, beruht die Überproduktion des dnaA Proteins auf Induktion der P_{I} Transkription bei Hitzeinaktivierung des C_{I} (ts)-Repressors. Ein Wechsel zu höherer Temperatur (42°C) führt jedoch auch gleichzeitig zur transienten Induktion der Proteine des "heatshock" Regulons (Neidhardt et al, 1984). Dabei wird auch das dnaK Protein, das in die Initiation der Replikation involviert ist, unter der Kontrolle des htpR Proteins (σ^{32} , Krüger und Walker, 1984) zusammen mit anderen Proteinen induziert (Neidhardt et al, 1983). Das dnaK Protein ist in dieser hitzeinduzierten Reaktion verantwortlich für das Abschalten der induzierten Proteine (Tilly et al, 1983). In dnaK Mutanten ist der RNA- und DNA-Metabolismus beeinflusst. Im in vitro Replikationssystem wird es zusammen mit den Replikationsproteinen O und P benötigt (Zylicz et al, 1983). Es hat eine ATPase-Aktivität und zumindest autophosphorylierende Protein-Kinase Aktivität. Bei in vivo Untersuchungen zu dnaA regulierten Prozessen durch Temperaturerhöhung sind folglich sich überlagernde oder bedingende Effekte nicht auszuschließen.

Daher wurde ein Plasmid verwendet, auf dem das dnaA Strukturgen ohne eigene Promotorregion vor den tac Promotor kloniert ist (pLSK5).

Der tac Promotor (Hybridpromotor aus trp und lac Promotor (Ammann et al, 1983), ist in Gegenwart des lacIq Repressorgens reprimiert und kann mit IPTG induziert werden. Die Konstruktion des Plasmids sowie die dnaA-Überproduktion mit diesem Plasmid ist in 3.5 beschrieben.

Als Wirtstamm wurde WM1151 (recA, lacIq8) verwendet. RNA wurde aus über 3h induzierten (1mM IPTG) und nicht induzierten Zellen isoliert. Abb. 10 zeigt das Ergebnis der S1-Analyse mit dem 5'- [³²P]-XhoI-MluI Fragment: Nach Induktion des dnaA Proteins über 3h wird die 16 Kd Transkription auf dem Chromosom reprimiert. Nach Induktion in mittlerer exponentieller Wachstumsphase ist kein 16 Kd Transkript mehr nachweisbar (Abb. 10b). Dieser Zeitpunkt der Induktion bedeutet, daß die Zellen nach 3h Induktion bis in die stationäre Phase gewachsen sind. Das Verschwinden des 16 Kd Transkriptsignals muß daher nicht gleichbedeutend sein mit vollständiger Repression, sondern kann auch Änderungen im RNA-Metabolismus (Stabilität der RNA) anzeigen. Nach Induktion in früher exponentieller Wachstumsphase wurde die 16 Kd Transkription stark aber nicht vollständig reprimiert (Abb. 10c).

Die 16 Kd Transkription in C600 ist deutlich stärker als im nicht induzierten WM1151/pLSK5 (Abb. 10, C600 u. a). Bei der Klonierung des Plasmids war eine Basalaktivität des tac Promotors bereits festgestellt worden (3.5). Auch im nicht induzierten Zustand des tac Promotors wird die dnaA (ts) Mutation komplementiert, er ist nicht vollständig reprimiert. Diese Basalexpression an dnaA Protein führt zu einer partiellen Repression des 16 Kd Promotors.

Der Repressionseffekt durch die dnaA Überproduktion ist ausgeprägter als der Derepressionseffekt in dnaA Mutanten (3.3.1). In dnaA Mutanten ist bereits bei permissiver

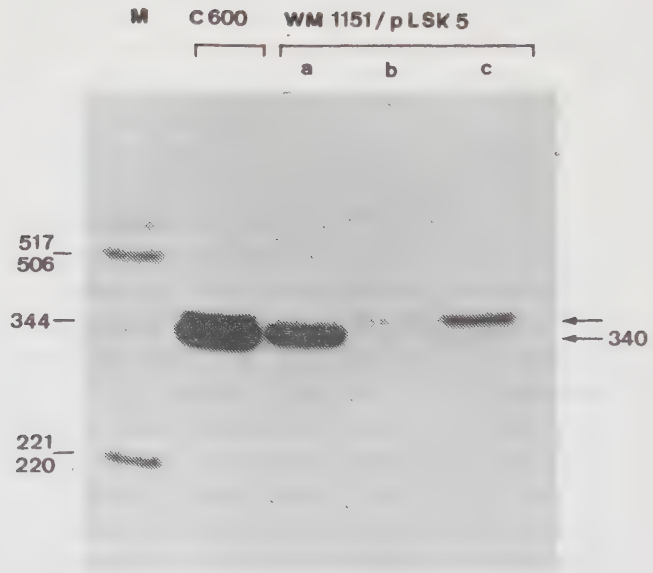


Abb. 10: Repression der 16 Kd Transkription nach Induktion des dnaA Proteins (Überproduktion)

150 µg RNA wurden in 50 µl Denat. Puffer mit 25000 cpm 5'-[³²P]-XhoI-MluI Fragment (Abb. 3) hybridisiert (3h, 54°C) und in 500 µl S1 Puffer mit 100 u S1 verdaut (30 min, 37°C). Gleiche Mengen wurden im 6 % PA/Harnstoffgel elektrophoretisiert. Autoradiogramm: 20h.

C 600: RNA wurde bei 4×10^8 Zellen/ml isoliert;
a) WM1151/pLSK5 ohne Induktion, Ernte bei 4×10^8 Z/ml; b) WM1151/pLSK5, Start-Titer 2×10^8 Z/ml, 3h Induktion; c) WM1151/pLSK5, Start-Titer 4×10^7 Z/ml, 3h Induktion (1mM IPTG).

Der obere Pfeil zeigt die Position des eingesetzten Fragmentes an (360 bp), der untere Pfeil das S1-geschützte Fragment.

Temperatur der Aktivität des dnaA Proteins beeinträchtigt (3.4.1), was offensichtlich zur leichten Derepression des 16 Kd Promotors führt und die Differenz zwischen reprimiertem und dereprimiertem Zustand verringert.

Zusätzlich zu den oben erwähnten Beweisen für die negative Kontrolle des 16 Kd Promotors durch dnaA Protein im in vitro System und in vivo in Fusionsklonen mit galK wurde diese negative Kontrolle damit auch in vivo auf dem Chromosom nachgewiesen. Die 16 Kd Region ist somit integraler Bestandteil eines im Zellzyklus regulierten bidirektionalen Replikationsorigins.

3.3.3 Termination der 16 Kd Transkription in dnaA und RNaseH Mutanten

Die offene Frage ist: Welche Funktion hat das 16 Kd Transkript bzw. die Transkription in der Initiation? Denkbar sind zwei grundsätzlich verschiedene Funktionen:

1. Die 16 KD Transkription verursacht eine negative Interferenz mit dem Initiationsereignis im Mimalorigin (z. B. Transkription), sie hätte dann eine inhibierende indirekte Funktion.
2. Das 16 Kd Transkript ist direkt und positiv als Primertranskript an der Initiation beteiligt.

Beide Funktionen setzen im Zellzyklus regulierte Transkription, Termination und Prozessieren des Transkriptes voraus.

Als erster Hinweis wurde das Vorhandensein terminierter oder prozessierter Produkte des 16 Kd Transkriptes ge-

sehen, die bei der Kartierung des 3'Endes nachweisbar waren (3.2.2).

Das dnaA Protein und/oder die RNase H (rnh) könnten an solchen Prozessen beteiligt sein.

Das dnaA Protein beeinflusst die Termination der Transkription am trp Attenuator positiv; bei restriktiver Temperatur steigt in dnaA Mutanten die Durchleseaktivität der RNA-Polymerase an (Atlung und Hansen, 1983). Suppressormutationen können auch mit dnaA modulierter Termination in Einklang stehen.

RNase H ist eine Endonuklease, die RNA in RNA/DNA schneidet. RNase H prozessiert in vitro das Primertranskript der Plasmide vom ColEl Typ (Tomizawa et al, 1982). Das Prozessieren des Primers ist Voraussetzung für die korrekte Inzeption der DNA-Synthese im ColEl Origin (Hillenbrand and Staudenbauer, 1982). Zudem ist sie an der Eliminierung längerer Primer-RNAs aus dem Template involviert (Ogawa and Okazaki, 1984).

Um einen Hinweis auf die Funktion des 16 Kd Transkriptes zu erhalten, wurde die Termination in dnaA und rnh Mutanten mit S1-Mapping untersucht.

In dnaA Mutanten wird durch Inaktivieren des dnaA Proteins die Termination des 16 Kd Transkriptes nicht beeinflusst (Abb. 11). Der Hauptanteil des 16 Kd Transkriptes durchläuft den Replikationsorigin im Wildtyp und auch in den dnaA Mutanten. (Dieselben RNA-Präparationen wie in 3.3.1 wurden verwendet.) Das Muster der terminierten oder prozessierten Transkripte ist nicht auffällig verändert.

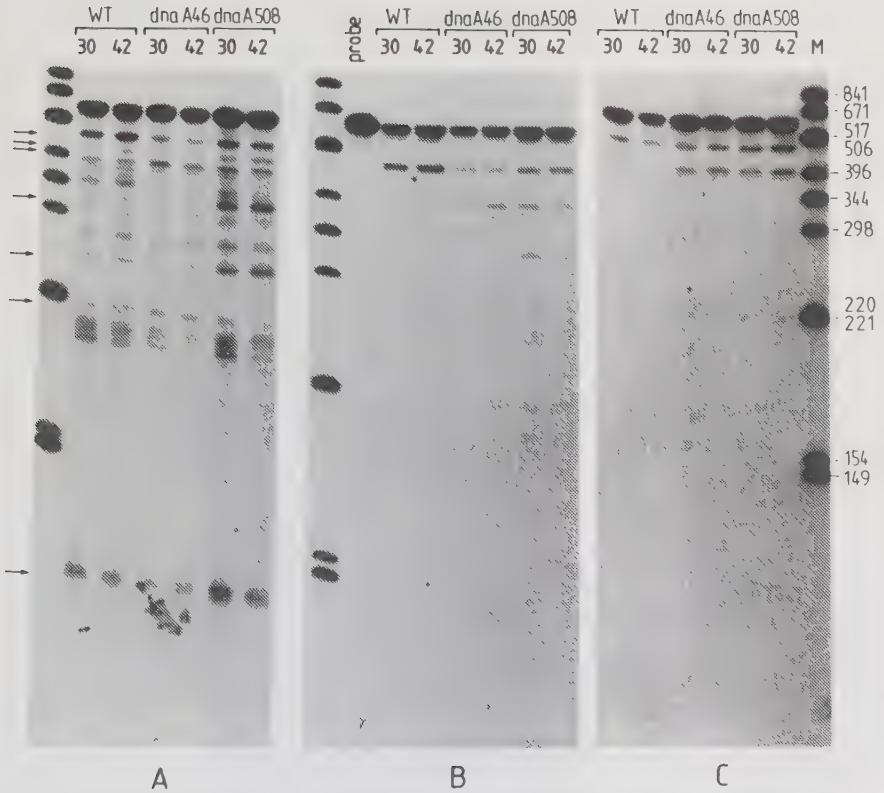


Abb. 11: Unveränderte Termination der 16 Kd Transkription
in *dnaA* Mutanten

150 µg RNA aus EC559 (W1), EC558 (*dnaA* 46), WM1140 (*dnaA* 508), bei 30°C und 42°C (60 min), wurden mit 25000 cpm RI-XhoI-[³²P]-3'-Fragment (Abb. 3) bei 49°C (a), 50°C (B), 51°C (C) 3h hybridisiert und in 500 µl mit 200 u S1 (30 min, 37°C) verdaut. Gleiche Mengen wurden im 8 % PA/Harnstoff Gel elektrophoretisiert. Autoradiogramm: 3 Tage

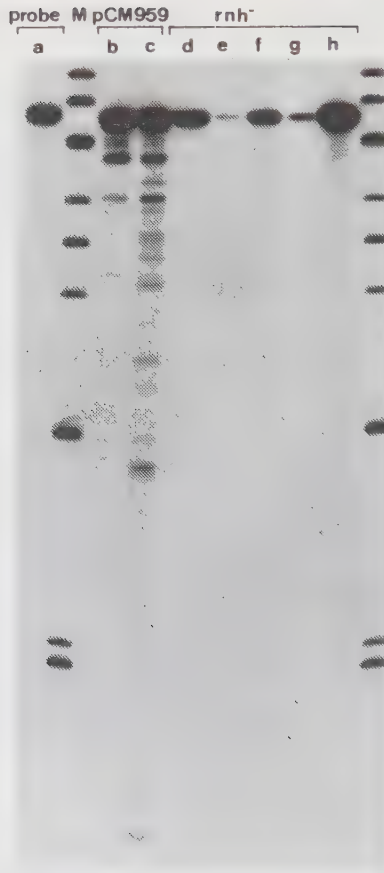


Abb. 12: Einfluß von RNase H auf die Termination der 16 Kd Transkription

150 µg RNA wurden mit 25000 cpm EcoRI-XhoI-³²P-3'Frag-
ment bei verschiedenen Temperaturen in 50 µl denat. Puf-
fer hybridisiert (3h) und in 500 µl S1-Puffer mit 200 u
S1 (30 min, 37°C) verdaut. Gleiche Mengen wurden in 8 %
PA/Harnstoffgel elektrophoretisiert. Autoradiogramm:
3 Tage

b) pCM959 (WM647), 51°C, c) pCM959, 49°C, d) WM1382
(rnh⁻), 51°C, e) tRNA, 51°C, f) WM1382 (rnh⁻),
g) tRNA, 50°C, h) WM1382 (rnh⁻), 49°C.

Das dnaA Protein ist damit nicht in die Termination der 16 Kd Transkription involviert.

In RNase H Mutanten ist dagegen ein drastischer Unterschied zu verzeichnen. Nur noch das Transkript der vollen Länge (Hybridisierungsprobe) liegt vor (Abb. 12). Das heißt, das 16 Kd Transkript wird im Origin nicht terminisiert, sondern durch RNase H prozessiert.

Die geschützte DNA ist nicht Resultat eines völlig unvollständigen S1-Verdaus; im Kontrollansatz mit unspezifischer tRNA ist deutlich weniger S1-geschütztes Material vorhanden. Die Ursache für die relative S1-Resistenz dieser Hybridisierungsprobe ist in 3.2.2 erörtert.

Aufgrund dieses Ergebnisses ist eine direkte Beteiligung des 16 Kd Transkriptes in der Initiation als Primer RNA wahrscheinlich. Die nicht völlige Reprimierbarkeit der 16 Kd Transkription durch das dnaA Protein in vivo paßt in dieses Bild.

Minichromosomen mit Minalorigin müssen demnach über einen Ersatzmechanismus verfügen (s. Diskussion).

3.4 Regulation des dnaA Proteins

Das dnaA Protein als oriC spezifisches Initiationsprotein ist umstritten in der Rolle als Regulator der Initiationsfrequenz.

Das gewichtigste Argument für die limitierende Funktion war die Reduktion der Originkonzentration in dnaA Mutanten bei intermediären Temperaturen (Hansen and Rasmussen, 1977; Messer et al, 1975; Tippe-Schindler et al. 1979) bzw. der Anstieg der Originkonzentration in kältesensitiven dnaA Suppressormutanten bei niedrigen Temperaturen (Kellenberger-Gujer, 1978). Beide Typen von Mutanten waren gleichzeitig Anlaß zur Postulierung einer autoregulierten Expression (Argumentation s. Einleitung).

Chloramphenikol verursacht in dnaA Mutanten bei intermediären Temperaturen eine Stimulierung der Initiation, genauso wie der Wechsel von restriktiver zu permissiver Temperatur in reversiblen dnaA Mutanten (Tippe-Schindler et al, 1979; Orr et al, 1978; Lycett et al, 1980).

Messer et al (1975) und Tippe-Schindler et al (1979) leiteten aus dem Chloremphenikol-Effekt ab, daß die Initiationsfrequenz normalerweise durch einen instabilen Repressor in Wechselwirkung mit dem positiv wirkenden dnaA Protein reguliert wird. Durch Hemmung der Proteinsynthese ist zu wenig Repressor vorhanden und Initiation kann trotz suboptimaler Konzentrationen an aktivem dnaA Protein stattfinden.

Lycett et al (1980) folgerten, daß der Mangel an dnaA Protein bei intermediärer Temperatur durch erhöhte Verfügbarkeit der RNA-Polymerase für die Transkription im Origin als Folge der Chloremphenikolwirkung (Shen and

Bremer, 1977) ausgeglichen wird. Demnach ist dnaA Protein mit RNA-Polymerase an der RNA-Synthese beteiligt.

Gegen die limitierende Rolle und Autoregulation des dnaA Proteins sprechen auch die Befunde von Sakakibara and Yausa (1982): danach soll dnaA Protein kontinuierlich synthetisiert werden und in dnaA Mutanten scheint bei restriktiver Temperatur nicht mehr Protein synthetisiert zu werden.

Die regulierte oder auch autoregulierte Expression des dnaA Proteins ist nach dem Autorepressor-Modell (Sompayrac and Maaløe, 1973) eine Grundvoraussetzung für ein regulatorisches Initiatorprotein. Nur so kann die Synthese des Initiatorproteins unabhängig von der Wachstumsrate der Zellen gewährleistet sein. Seine Konzentration wird durch die Autoregulation nahezu konstant gehalten (Synthese proportional zur Volumenzunahme), nach der notwendigen Akkumulation am Replikationsorigin wird Initiation ausgelöst.

Neuere Untersuchungen unterstützen das Postulat einer autoregulierten dnaA Expression (Atlung et al, 1984; Braun et al, 1985).

Das dnaA-Gen liegt bei 82,5 min auf dem E. coli Chromosom und ist mittlerweile sequenziert (Hansen et al, 1982a; Hansen et al, 1982b). Die dnaA-Region mit ihren Genfunktionen ist ausführlich in 3.5 beschrieben. An dieser Stelle wird nur auf die Daten eingegangen, die im Zusammenhang mit der autoregulierten Expression des dnaA Proteins von Bedeutung sind.

Direkt hinter dem dnaA Gen liegt das dnaN Gen, das für die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III kodiert (Burgers et al, 1981). Es wird kotranskribiert mit dem

dnaA Gen (Sako and Sakakibara, 1982).

Aus der Sequenzanalyse folgte, daß zwei mögliche Promotoren zur dnaA Transkription vorliegen. Beide Promotoren sind aktiv (Hansen et al, 1982a). Zwischen den beiden Promotoren befindet sich eine dnaA Bindungsstelle (Fuller et al, 1984, Abb. 13). Dieser 9bp Repeat ist identisch mit dem des 16 Kd Promotors. Anhand der Klonierung von Restriktionsfragmenten aus der dnaA Kontrollregion vor das tet-Gen oder lacZ-Gen konnte gezeigt werden, daß die Transkription durch ein zweites, in die Zelle eingebrachtes dnaA⁺ Plasmid reprimiert wird (Atlung et al, 1984; Braun et al, 1985). Nach Deletion des 9bp Repeat ist der Repressionseffekt nicht mehr vorhanden.

Zur Untersuchung der Autoregulation der dnaA Transkription in vivo auf dem Chromosom wurde hier wiederum das S1-Mapping verwendet. Die dnaA Transkription wurde dazu in dnaA Mutanten bei restriktiver Temperatur in Gegenwart eines dnaA überproduzierenden Plasmids und in Gegenwart zusätzlicher Origins in der Zelle analysiert.

3.4.1 dnaA Transkription in dnaA Mutanten

Die Aktivität beider Promotoren des dnaA Gens und das 5'Ende ihrer Transkripte waren bereits mit S1-Mapping nachgewiesen worden (Hansen et al, 1982a). Das Transkript des dnaA1 Promotors ist um ca. 80 b länger als das Transkript des dnaA2 Promotors (Abb. 13). Beide Transkripte haben einen relativ langen, nicht translatierten Bereich am 5'Ende. Weder die Bedeutung der Existenz zweier Transkripte noch ihrer "leader" Region ist bekannt.

Zur S1-Analyse wurde RNA aus der dnaA 46 Mutanten (EC558) und der dnaA 508 Mutanten (WM1140) bei permissiver (30°C) und restriktiver Temperatur (30 min oder 60 min bei 42°C) isoliert. Zur Kontrolle des Temperatureffektes wurde auch RNA aus dem isogenen Wildtyp (EC559) der dnaA 46 Mutanten isoliert. Das Ergebnis der S1-Analyse ist in Abb. 13 dargestellt; in Tabelle 2 ist die Auswertung der Messung der Intensität der einzelnen Banden zusammengefaßt.

Die Transkriptstarts, die in dieser S1-Analyse kartiert wurden, sind identisch mit dem Ergebnis von Hansen et al (1982a).

Die dnaA Expression ist auf Transkriptionsebene autoregulierte. Die Transkription von beiden Promotoren ist bei nicht permissiver Temperatur erhöht (Abb. 13).

Im Wildtyp ist der dnaA 2 Promotor fast 3 mal stärker als der dnaA 1 Promotor (Tab. 2 B). Der Grund dafür kann unterschiedliche Regulation, Promotorstärke oder Transkriptstabilität sein. Die Temperaturerhöhung führt im Wildtyp zu einer Abnahme der Transkriptmenge, wobei in diesem Fall das dnaA 2 Transkript stärker abnimmt. Diese unterschiedliche Abnahme ist nicht immer zu verzeichnen (s. z. B. Abb. 15a); daher wurde auf eine Temperaturkorrektur verzichtet.

In den dnaA Mutanten dagegen steigt die Transkriptionsaktivität beider Promotoren um einen Faktor 2 - 4 nach Erhöhung der Temperatur (Tab. 2 C). Durch die Inaktivierung des dnaA Proteins wird der Unterschied in der Transkriptionseffizienz beider Promotoren deutlich reduziert (Tab. 2 B). Diese Veränderung deutet darauf hin, daß der dnaA 1 Promotor stärker durch die dnaA Kontrolle betroffen ist. Die Lage der Bindungsstelle zwischen den beiden Promotoren läßt dies einsichtig erscheinen (Abb. 13).

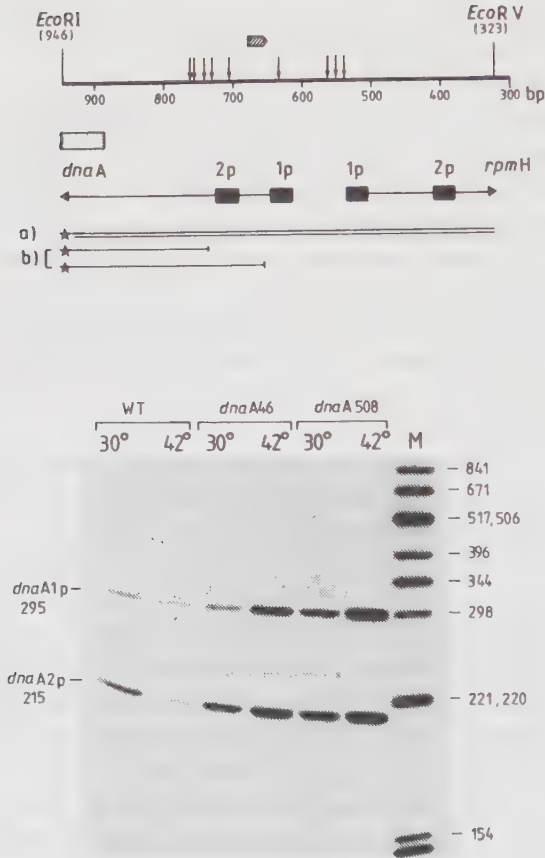


Abb. 13: Derepression der *dnaA* Transkription in *dnaA* Mutanten bei restriktiver Temperatur

150 µg RNA aus EC559, EC558, WM1140 (WT, *dnaA46*, *dnaA508*, 30° + 42°C) wurden mit 25000 cpm 5'-[³²P]-*EcoRI*-*EcoRV* Fragment in 30 µl denat. Puffer (3h, 52°C) hybridisiert, in 300 µl SI-Puffer mit 50u SI (30 min, bei 37°C) verdaut. Gleiche Mengen werden im 6 % PA/Harnstoffgel elektro-phoretisiert. Autoradiogramm: 2 Tage.

Die Übersichtskarte der Promotorregion mit 9 bp Repeat von *dnaA* zeigt gleichzeitig die Hybridisierungsprobe (a) und die Länge der beiden SI-geschützten DNA-Fragmente (b).

Die vertikalen Pfeile zeigen die Lage der GATC Sequenzen an.

s. auch Abb. 16: Übersicht der *dnaA* Region

Tabelle 2: Autoregulation des dnaA Proteins (Abb. 13)

Stamm /	WT EC559		<u>dnaA46</u> EC559		<u>dnaA508</u> WM1140		
	30°	42°	30°	42°	30°	42°	
A	<u>dnaA1p</u>	1.0	0.7	1.1	4.4	2.8	8.7
	<u>dnaA2p</u>	2.7	0.7	3.0	5.8	4.7	7.8
B	<u>dnaA2p</u>	2.7	1.0	2.7	1.3	1.7	0.9
	<u>dnaA1p</u>						
C	<u>dnaA1p</u>	1.0	0.8	1.0	4.0	1.0	3.2
	<u>dnaA2p</u>	1.0	0.3	1.0	1.9	1.0	1.7

Die Intensität der Banden wurde mit einem Lazerscanner (LKB) vermessen und integriert.

In A sind die Werte auf dnaAlp von EC559/30°C normiert; in C sind sie auf dnaAlp und dnaA2p der jeweiligen RNAs bei 30°C normiert; damit ist ein paarweiser (30°C/42°C) Vergleich und auch der Vergleich der Stämme untereinander möglich.

Wahrscheinlich ist daher nicht die eigentliche Promotorstärke oder Transkriptstabilität Ursache des Unterschiedes, sondern ihre Kontrolle. Zusätzliche Kontrollen der dnaA Expression sind nicht auszuschließen.

In dieser Analyse ist gleichzeitig zu sehen, daß bereits bei permissiver Temperatur das mutierte dnaA Protein weniger aktiv ist. Bei 30°C ist mehr Transkript vorhanden als im Wildtyp (Tab. 2 A). Der Effekt ist in der irreversiblen dnaA 46 Mutanten ausgeprägter als in der reversiblen dnaA 508 Mutanten. Dies erklärt den geringen Derepressionseffekt auf die 16 Kd Transkription in dnaA Mutanten.

Der trotzdem starke Derepressionseffekt auf die dnaA Transkription in dnaA Mutanten bedeutet eine relativ stringente Kontrolle durch die Autoregulation.

Wie im Falle des 16 Kd Promotors sollte auch die Repression der chromosomalen dnaA Transkription bei Überproduktion des dnaA Proteins durch pLSK5 (ptac dnaA Plasmid) zu sehen sein. Das entsprechende Experiment ist in Abb. 14 dargestellt. Nach Induktion (3h) des tac Promotors (WM1151/pLSK5) ist kein chromosomales Transkript mehr nachweisbar.

Die Hybridisierungsprobe ist auch einem bestimmten Bereich des plasmidkodierte Transkriptes komplementär (HindII-EcoRI, Pos. 824-946, Abb. 16). Die Länge des Schätztes Fragmentes stimmt genau damit überein (ptac 120 b). Dies bestätigt nochmals, daß die ptac dnaA-Fusion Überproduktion des dnaA Proteins erlaubt (3.5). Auf eine Quantifizierung wurde verzichtet, da die Hybridisierungstemperatur für das plasmidkodierte Transkript nicht optimal war.

Mit diesen beiden Ergebnissen ist die Autoregulation der

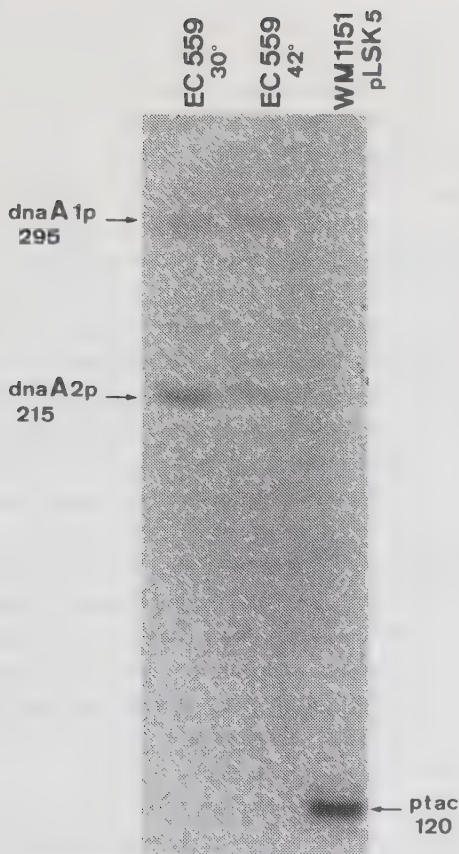


Abb. 14: Repression der chromosomalen *dnaA* Transkription nach Induktion des *dnaA* Proteins auf pLSK5

Das S1-Mapping wurde genau wie in Abb. 13 durchgeführt. RNA war aus früh in der exponentiellen Wachstumsphase induzierten Zellen (WM1151/pLSK5; 1mM IPTG, 3h) isoliert worden.

Die beiden geschützten Fragmente *dnaA*1p und *dnaA*2p zeigen die chromosomalen Transkripte an (Abb. 13), *ptac* 120 zeigt das plasmidkodierte Transkript an.

dnaA Transkription auf dem Chromosom in vivo belegt. Atlung et al (1984) leiteten aus ihren unterschiedlichen dnaA-Promotor-lacZ Fusionen eine Autorepression ab, die nur den dnaA2 Promotor betreffen soll. Anhand ihrer Konstruktionen konnten sie jedoch keine fundierte Aussage über den dnaA1 Promotor machen. Die Untersuchungen von Braun et al (1985), die wenig später veröffentlicht wurden, bestätigen das Ergebnis der S1-Analyse. Sie interpretierten aus ihren Daten zur Reprimierbarkeit verschiedener dnaA Promotor-lacZ Fusionen durch dnaA Protein eine Regulation beider Promotoren. Wirklich eindeutig und direkt gezeigt, ist dies jedoch nur mit dieser S1-Analyse. Zusätzlich zur Repression ist mit der S1-Analyse auch die Derepression der dnaA Transkription bei restriktiver Temperatur in dnaA Mutanten nachgewiesen.

Braun et al (1985) und Atlung et al (1984) konnten durch Deletionen zeigen, daß die Anwesenheit des 9 bp Repeats für den Repressionseffekt verantwortlich ist. Das dnaA Protein bindet nach ihren DNaseI foot-printing Analysen auch zu beiden Seiten der Promotoren und nach Fuller et al (1984) auch noch am Anfang des Strukturgens, wo nochmals eine 9 bp Sequenz vorliegt.

Man weiß, daß alleine das Vorhandensein eines 9 bp Repeats zur Bindung des dnaA Proteins nicht ausreicht, Sequenzen in der Nachbarschaft müssen eine Rolle spielen. Es gibt Repeats, die nicht von dnaA Protein erkannt werden (z. B. i. ATP-Operon), und umgekehrt auch DNA-Sequenzen, die gebunden werden, obwohl keine gute Homologie zur Konsensussequenz vorhanden ist (Fuller et al, 1984).

3.4.2 Titration des dnaA Proteins

In vivo bindet das dnaA Protein kooperativ an die 9 bp Repeats des Minimalorigins, an das Repeat des 16 Kd Promotors und in seiner eigenen Promotorregion (neben anderen 9 bp Repeats). Dabei reguliert es die 16 Kd Transkription und seine eigene Transkription negativ. Seine Funktion im Minmalorigin ist unverstanden. Man weiß allerdings, daß die Bindungsaffinität für die verschiedenen Repeats unterschiedlich ist: Die Bindung im Minimalorigin erfolgt besser und schneller als an die 16 Kd Promotorregion und dnaA Promotorregion. Letztere sind gleichwertig in der Bindung (Fuller et al, 1984).

Nach Sakakibara and Yausa (1982) sollen ca. 400 Moleküle stabil in der Zelle vorliegen. Dies war eines der Argumente gegen die limitierende Funktion des dnaA Proteins. Diese Zahl besagt jedoch nichts über die Konzentration an freiem und gebundenem dnaA Protein in der Zelle. Man kann sich vorstellen, daß eine regulatorische Funktion des dnaA Proteins durch Veränderung der freien Konzentration an dnaA Protein erfolgt.

Die Anwesenheit von Minichromosomen in der Zelle bedeutet eine Erhöhung der Anzahl der Bindungsstellen und sollte zur Titration des dnaA Proteins und folglich zur Derepression seiner eigenen Transkription führen.

Um dies zu testen, wurde die dnaA Transkription in einem plasmidfreien Stamm (EC559) verglichen mit der Transkription in Stämmen, die verschiedene oriC-Plasmide enthalten, pCM959 (WM647) und pLSK1.7 (HB 101). pCM959 ist das bereits beschriebene Minichromosom mit 16 Kd Region (fünf 9 bp Repeats) mit 20 Kopien pro Zelle (Abb. 1 B). pLSK1.7 ist ein pBR322-Derivat (pFD51, B. Rak), in den

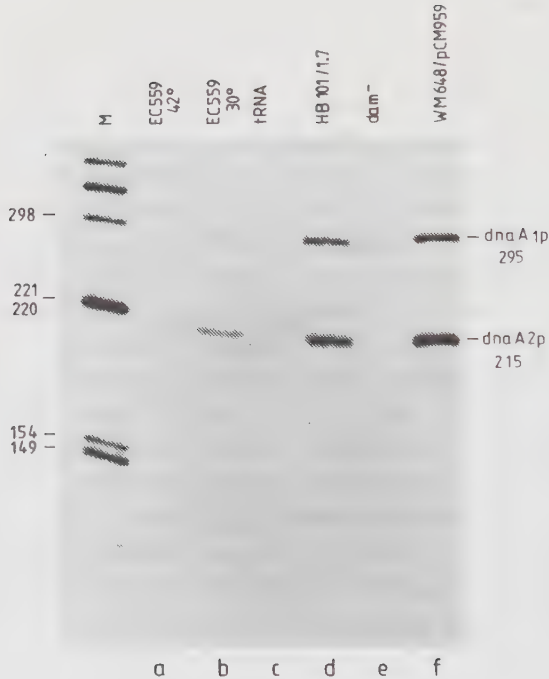


Abb. 15: Titration des dnaA Proteins

Die Sl-Analyse wurde wie in Abb. 13 durchgeführt. Die dnaA1p und dnaA2p zeigen die dnaA Transkripte an (s. Übersicht Abb. 13). HB101/1.7 steht für HB101/pLSK1.7. Zu dam (WM1091) s. 3.4.3.

Tabelle 3: Titration des dnaA Proteins (Abb. 15)

	EC559 42	EC559 30	HB101 pLSK1.7	WM648 pCM959	WM1091	Stamm
A	0.7	1.0	4.3	6.1	1.1	<u>dnaA1p</u>
	1.0	2.5	6.8	11.4	-	<u>dnaA2p</u>
B	0.7	1.0	4.3	6.1	-	<u>dnaA1p</u>
	0.4	1.0	2.7	4.6	-	<u>dnaA2p</u>
C	1.4	2.5	1.6	1.9	-	<u>dnaA1p</u>
						<u>dnaA2p</u>

Die Intensität der Banden auf dem Autoradiogramm wurde mit einem Lazerscanner (LKB) vermessen und integriert. Die Werte in A wurden auf dnaA1p von EC559/30°C normiert, in B wurden alle dnaA1p Werte auf dnaA1p von EC559/30°C normiert, entsprechendes gilt für die Werte der dnaA2-Promotoren.

das XhoI-SmaI Fragment (vier 9 bp Repeats) der Origin-region kloniert wurde (Abb. 1, M. Schauzu). Da dieses Fragment ein funktioneller Origin ist, liegt das Plasmid in der doppelten Kopiezahl vor als der pBR322 alleine (Meyenburg et al, 1984), d. h., 60 Kopien pro Zelle.

Das dnaA Protein wird durch beide Plasmide titriert; in beiden Stämmen ist mehr dnaA Transkript vorhanden, als in dem plasmidfreien Stamm (EC559), (Abb. 20, Tab. 3).

Von beiden Promotoren wird wiederum effizienter transkribiert, die Transkription von dnaAlp steigt um einen Faktor 4 bis 6, von dnaA2p um einen Faktor 3 bis 4.5. Die Depression der Transkription ist in pCM959-haltigen Zellen etwas stärker als in Zellen mit pLSK 1.7, trotz der niedrigeren Kopiezahl von pCM959. Eine Interpretation ist, daß weitaus mehr dnaA Protein benötigt wird in Gegenwart der 16 Kd Transkription als einer Proportionalität zur Anzahl der 9 bp Repeats entspricht.

In Ergänzung dazu steht folgende Beobachtung: Minichromosomen mit 16 Kd Region führen in dnaA Mutanten zu extremer Inkompatibilität gegenüber dem Chromosom, die sich in langsamem Wachstum der Zellen bei permissiver Temperatur und in einem hohen Anteil plasmidfreier Zellen dokumentiert. Die entsprechenden oriC-pBR322 Derivate führen ebenfalls zu deutlicher Inkompatibilität, während oriC-pBR322 Derivate mit Minimalorigin diesen Effekt nur in geringem Maße verursachen (M. Schauzu, pers. Mitteilung).

Meyenburg et al (1984) konnten zeigen, daß dnaA-Mangel die Ursache ist; Einführung eines dnaA⁺-Plasmids stellte den normalen Phänotyp wieder her.

Autoregulation des dnaA Proteins läßt eine ungefähr

10fache Stimulierung der Transkription zu (Tab. 3). Braun et al (1985) beschrieben eine bis zu 10fache Repression der dnaA Transkription in Gegenwart eines dnaA⁺ Plasmides, was mit dem Ergebnis in Abb. 14 in Einklang steht. Durch die Autorepression kann also die Expression des dnaA Gens um einen Faktor 100 variiert werden.

Eine mögliche regulatorische Funktion des dnaA Proteins durch Titration wurde schon von Fuller et al (1984) aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten des dnaA Proteins vorgeschlagen. Direkt nach der Initiation der Replikation, die zu einer Duplikation der oriC DNA und damit Titration des dnaA Proteins führt, kann durch die erniedrigte Konzentration an freiem dnaA Protein zur verstärkten Expression anderer Gene führen, bis die Normalkonzentration wiederhergestellt ist. Nach dieser Vorstellung könnte man z. B. eine im Zellzyklus regulierte 16 Kd Transkription postulieren.

3.4.3 dnaA Transkription in dam Mutanten

Die dnaA Promotorregion zeichnet sich ähnlich wie die Originregion durch eine Anhäufung an dam-Methylase Erkennungsstellen aus (9 GATC Sequenzen innerhalb eines 225 bp Fragmentes; Hansen et al, 1982a, Abb. 13). Im dnaA2 Promotor sind -10 und -35 Region davon betroffen, in dnaA1 Promotor liegt eine GATC Sequenz genau zwischen den Promotorboxen. Die Mehrzahl der GATC Sequenzen befindet sich direkt anschließend an den dnaA2 Promotor im noch nicht kodierenden Bereich des dnaA Gens.

Dam-Methylierung kann mit Transkription interferieren, wie für das mom Gen des Phagen Mu gezeigt wurde (Kahmann 1983, Plasterk et al, 1983; Plasterk et al, 1984).

In dam Mutanten wird das mom Gen nicht transkribiert, aufgrund der fehlenden G^mATC-Methylierung vor dem Promotor.

Lark (1968) schlug bereits eine Funktion der dam-Methylierung in der Replikation vor. Dam-Methylierung ist für die autonome Replikation von Minichromosomen erforderlich. Transformation von Minichromosomen in dam Mutanten resultiert in einer drastischen Reduktion der Transformationseffizienz (i. Vgl. zu pBR322) bzw. es werden nur Transformanten erhalten, die das Minichromosom integriert haben (Messer et al, 1985; Smith et al, 1985). Im in vitro Replikationssystem dagegen ist bei fehlender dam-Methylierung nur eine 50 %ige Reduktion zu verzeichnen (Messer et al, 1985; Hughes et al, 1984). Die Replikation wurde durch dnaA-Komplementation gemessen, d. h. das dnaA Protein war hier nicht limitierend.

DAM-abhängige dnaA-Expression könnte die Ursache der dam-Abhängigkeit der Minichromosomen-Replikation sein. Der Einfluß der dam-Methylierung auf die dnaA Transkription wurde daher in einer dam-Mutanten (WM1091, dam-3) untersucht. Mit S1-Mapping ist die dnaA2 Promotoraktivität nicht mehr nachweisbar, der dnaA1 Promotor zeigt normale Transkriptionseffizienz (Abb. 15). In dam-Mutanten ist die dnaA-Expression folglich stark reduziert. Dam-Mutanten sind jedoch auch in Gegenwart eines dnaA⁺-Plasmides mit Minichromosomen nicht mit erhöhter Effizienz transformierbar (W. Messer, pers. Mitteilung). Die dnaA Limitierung kann daher nicht der einzige Grund für die fehlende Replikation der Minichromosomen in dam-Mutanten sein. Die nur 50 %ige Stimulierung der in vitro Replikation von Minichromosomen mit dam⁻-Extrakt unterstützt diese Aussage (Messer et al. 1985).

Auch bei/in den Origin-Promotoren sind GATC Sequenzen

vorhanden, deren Methylierung für die Promotoraktivität wichtig sein kann. Bisher wurde nur der 16 Kd Promotor auf dam-Abhängigkeit untersucht. Eine GATC-Sequenz befindet sich in der -35 Region dieses Promotors (Abb. 6). Das Ergebnis ist in Abb. 7 dargestellt. Die Transkription des 16 Kd Promotors ist in dam-Mutanten auf die Hälfte reduziert.

Im Gegensatz zu Minichromosomen kann das Chromosom ohne dam-Methylierung replizieren, dam-Mutanten sind lebensfähig (Marinus et al, 1973; 1983). Es wurde vorgeschlagen, daß die dam-Methylierung bei der Replikation eine Funktion im "Spacing" der Replikationsgabeln hat (Messer et al, 1985). Die Anhäufung des Initiationspotentials in dnaA Mutanten bei restriktiver Temperatur führt bei Wechsel zur permissiven Temperatur zu zweimaliger Initiation. Das zweite Initiationsereignis findet 20 min nach dem ersten statt (Evans and Eberle, 1975; Helmstetter and Krajewski, 1982). In dam-Mutanten ist dieses Zeitintervall auf 10 min verkürzt (Messer et al, 1985). Reinitiation würde demnach von dem Methylierungszustand der oriC DNA abhängen.

Da sowohl die dnaA Expression als auch die 16 Kd Transkription in dam-Mutanten reduziert ist, muß man annehmen, daß die chromosomale Replikation möglicherweise dnaA und oriC unabhängig erfolgt. Minichromosomen können nicht nach diesem veränderten Mechanismus replizieren, auch methylierte DNA ist nicht transformierbar (Messer et al, 1985). Replikation nach dem "Stable replication" Modus (s. 3.3.3) liegt jedoch nicht vor (Messer et al, 1985). Die dnaA-Abhängigkeit der Replikation in dam-Mutanten wird derzeit untersucht.

3.5 Klonierung und Überproduktion des dnaA Proteins

A Klonierung des dnaA Gens ohne die dnaN-gyrB Region

Im Zusammenhang mit der Konstruktion eines dnaA überproduzierenden Plasmids sollte eine offene Frage nach der Ursache von Klonierungsschwierigkeiten des dnaA Gens auf Plasmidvektoren, sogar unter Kontrolle des ΔP_R Promotors.

Die damalige Erklärungsmöglichkeit war die postulierte limitierende Rolle des dnaA Proteins in der Regulation der Initiation; Überproduktion des dnaA Proteins könnte deshalb letal für die Zelle sein.

Eine Reihe von anderen, meist späteren Arbeiten beschrieb jedoch die Klonierung des dnaA Genes, sowohl mit eigener Promotorregion als auch unter Kontrolle anderer regulierbarer Promotoren (Miki et al, 1979; Fuller and Kornberg, 1983; Churchward et al, 1983; Atlung et al, 1984; Meyenburg et al, 1984).

Im Vergleich der verschiedenen Konstruktionen fiel ein wesentlicher Unterschied auf: in allen Fällen, in denen die Klonierung problemlos möglich war, wurde ein DNA-Fragment verwendet, das keine weiteren Gene nach dem dnaA Gen trug. Chakraborty (1982) hatte jedoch längere Fragmente zur Klonierung eingesetzt. Es lag nahe, die Ursache für die Nichtklonierbarkeit in den Genfunktionen zu suchen, die nach dem dnaA Gen liegen.

Die dnaA Region wurde anhand spezialisiert transduzierender Phagen genetisch und physikalisch isoliert (Hansen and Meyenburg, 1979; Miki et al, 1979; Sahakibura and Mizukami, 1980; Chakraborty, 1982; Ream et al, 1980). Die Anordnung der Gene in der dnaA Region ist folgende: gyrB, recF, dnaN, dnaA, rpmH, rnpA (s. Abb. 16).

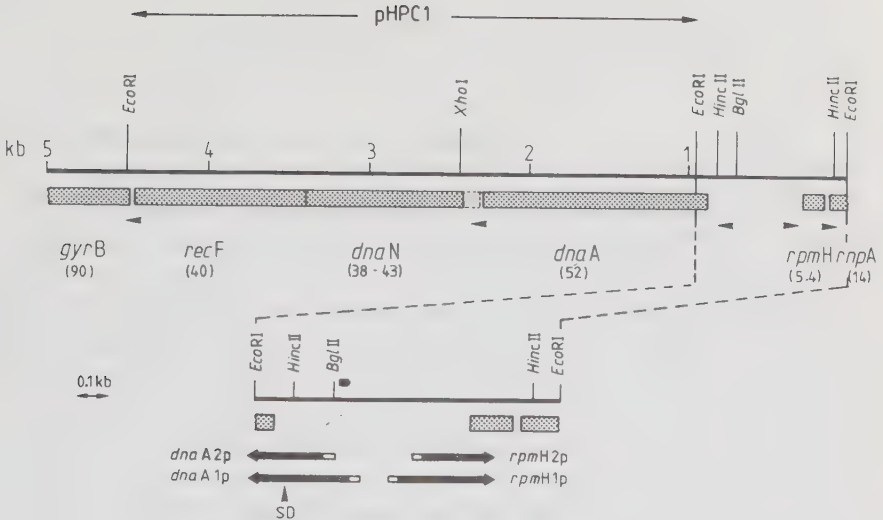


Abb. 16: Struktur der *dnaA* Region

Die Leserahmen der Gene sind als Blöcke (gepunktet) eingezeichnet. Zur Translation des *dnaN* Transkriptes (bzw. *dnaA-dnaN* Transkript) sind mehrere Initiationskodons möglich, dies ist durch den unausgefüllten Teil gekennzeichnet (Hansen et al, 1982b; Adachi et al, 1984). Die Promotoren sind mit Pfeilen in Transkriptionsrichtung angegeben. Das *dnaA* Promotorfragment ist vergrößert abgebildet, mit den Tandem-Promotoren von *dnaA* und *rpmH*. Die *dnaA* Bindungsstelle (9 bp Repeat) ist mit dickem Pfeil gekennzeichnet (SD = Ribosomen Bindungsstelle). Bezugspunkt der Koordinaten ist der Anfang des 0.95 kb *EcoRI*-Fragmentes (rechts außen). Die für die Klonierungen wichtigen Restriktionsstellen und das 3.5 kb *EcoI* in pHPC1 sind eingezeichnet. Das 12.6 kb *HindIII*-Fragment in 47.16 beginnt direkt neben der rechten *EcoRI*-Schnittstelle des 0.95 kb *EcoRI*-Fragmentes, es umspannt 12.6 kb DNA nach links.

Das gyrB Protein ist die B Untereinheit der Gyrase. Neben ihrer Funktion in der Topologiekontrolle (Gellert, 1981) und Initiation der oriC Replikation, ist die Gyrase in vitro an illegitimen Rekombinationsprozessen beteiligt (Naits et al, 1984).

Das recF Protein ist im "recF pathway" an Rekombinationsprozessen beteiligt (Clark, 1980; Laban and Cohen, 1980). Es spielt eine Rolle in der UV induzierten DNA-Synthese und der postreplikativen Reparatur (Ream et al, 1980).

Das dnaN Protein ist die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III (Burgers et al, 1981). Es liegt in ca.10facher Konzentration gegenüber dem Holoenzym vor. Im Komplex jedoch ist eine genaue Stöchiometrie aller Komponenten gegeben.

Das rpmH Gen kodiert für das ribosomale Protein L 34, rpnA ist das Gen der Proteinkomponenten der RNase P (Hansen et al, 1984).

Die ganze Region bis einschließlich des Beginns von gyrB ist mittlerweile sequenziert und die Gene in der Sequenz identifiziert (Hansen et al, 1982a, Hansen et al, 1982b; Adachi et al, 1984; Blonar et al, 1984). Das recF Gen überlappt mit dem dnaN Gen um 1 Nukleotid.

Die Gene werden von dnaA bis gyrB in derselben Richtung transkribiert, rpmH und rpnA Transkription erfolgt in entgegengesetzter Richtung. Die Transkriptionsstarts von rpmH, dnaA und gyrB wurden durch S1-Kartierung ermittelt (Hansen et al, 1982a; Adachi et al, 1984). rpmH und dnaA werden von je 2 Promotoren aus transkribiert. Ein 9 bp Repeat, an das das dnaA Protein bindet, liegt zwischen den beiden Promotoren des dnaA Gens. Die Regulation der

dnaA Expression ist in 3.4 untersucht.

Der Promotor des gyrB Gens liegt am Ende des recF Genes, die Transkription beginnt direkt am Ende des Leserahmens von recF. Die gyrB Promotoraktivität wird durch die Topologie der DNA reguliert, im relaxierten Zustand ist er aktiver (Menzel and Gellert, 1983, 1984).

Nach der Expressionsanalyse von verschiedenen Phagen und Plasmiden der dnaA-dnaN Region und in vitro Transkriptionsexperimenten werden dnaN mit dnaA kotranskribiert, obwohl es einen eigenen schwachen Promotor hat (Sako und Sakakibara; Sakakibara et al, 1981; Chakraborty, 1982; Kölling, 1983).

Ob recF zu den Operon gehört ist unklar. Es konnte kein Promotor nachgewiesen werden. Die recF Expression konnte nur durch Klonierung vor ΛP_R ohne das davorliegende intakte dnaA und dnaN Gen gezeigt werden (Ream and Clark, 1984).

Das kürzeste Fragment, das von Chakraborty (1982) erfolgreich zur Klonierung verwendet wurde, reichte bis zur EcoRI-Schnittstelle im gyrB Gen (Abb. 16). Die Klonierung des 3.5 kb EcoRI-Fragmentes alleine in pBR322 war möglich (pHPC1, Chakraborty, 1982). Es trägt den Hauptteil des Strukturgens von dnaA, dnaN, recF und den Beginn des gyrB-Genes. Die dnaA Promotorregion fehlt. Die Klonierung beider Fragmente gleichzeitig (partieller Verdau) war nicht möglich.

Wenn die Vermutung stimmt, daß die Gene nach dem dnaA Gen (bzw. ihre Expression) Ursache für die Nichtklonierbarkeit sind, sollte man nach Deletion von dnaN, recF und p gyrB auf pHPC1 das funktionelle dnaA Gen herstellen können.

Dazu wurde pHPC1 mit AvaI geschnitten (erkennt auch XhoI-Schnittstellen): Es entstehen 2 Fragmente; eines trägt dnaN, recF und das tet-Gen, das andere das bla-Gen mit pBR 322 Origin und das partielle dnaA Gen. Nach Auffüllen der überstehenden Enden mit Klenow-Polymerase und Religierung wurde die DNA in WM 648 (recA) transformiert und auf ampicillin-resistente und tetrazyklin-sensitiven Transformanten selektioniert. Alle so selektionierten Transformanten enthielten das Plasmid der erwarteten Größe von 4.4 kb und der erwarteten Restriktionsmuster (pLSK3, Abb. 17, 18).

In die EcoRI-Schnittstelle von pLSK3 wurde das 0.95 kb Promotorfragment des dnaA Gens (Abb. 16) inseriert. Dieses Fragment war aus AN607.8 isoliert worden. AN607.8 trägt die intakte dnaA Region (Chakraborty, 1982; 0,95 kb + 3.5 kb EcoRI-Fragment). Klonierung in den Vektor ANM607 führt zu lytischen Phagen (Murray et al, 1977); Interferenzen mit der Wirtszelle durch einklonierte Genfunktionen spielen daher keine Rolle mehr. Die DNA aus dem Ligierungsansatz mit pLSK3 und dem dnaA Promotorfragment wurde in eine dnaA 508 Mutante (WM1140, recA) transformiert und ampicillin-resistente Zellen bei 42°C selektioniert.

Die temperaturresistenten Transformanten enthielten das erwartete Plasmid mit dem dnaA Promotorfragment in der richtigen Orientierung (Abb. 16, 17, pLSK4, 5.37 kb).

Um mögliche Rekombination mit dem Mutantenallel auf dem Chromosom auszuschließen, wurde das isolierte Plasmid retransformiert; es komplementierte noch die dnaA Mutation. Die Zellen wachsen normal bei 30°C und sind folglich auch keine kältesensitiven Suppressor-Mutanten (Kellenberg-Gujer, 1978).

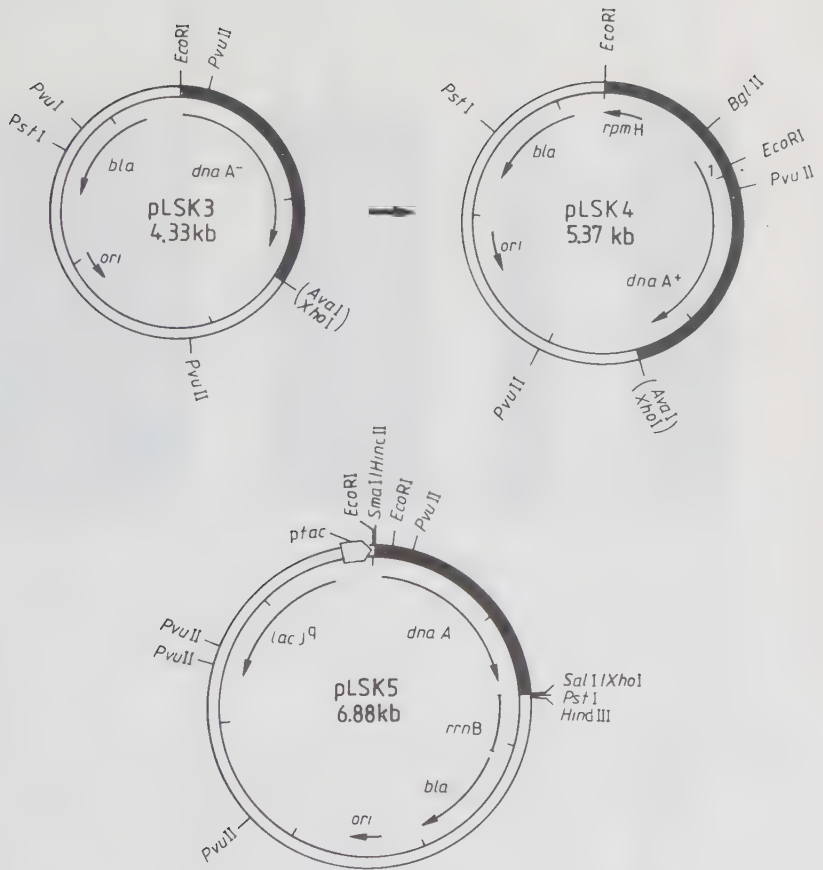


Abb. 17: Restriktionskarten der Klone
pLSK3, pLSK4, pLSK5

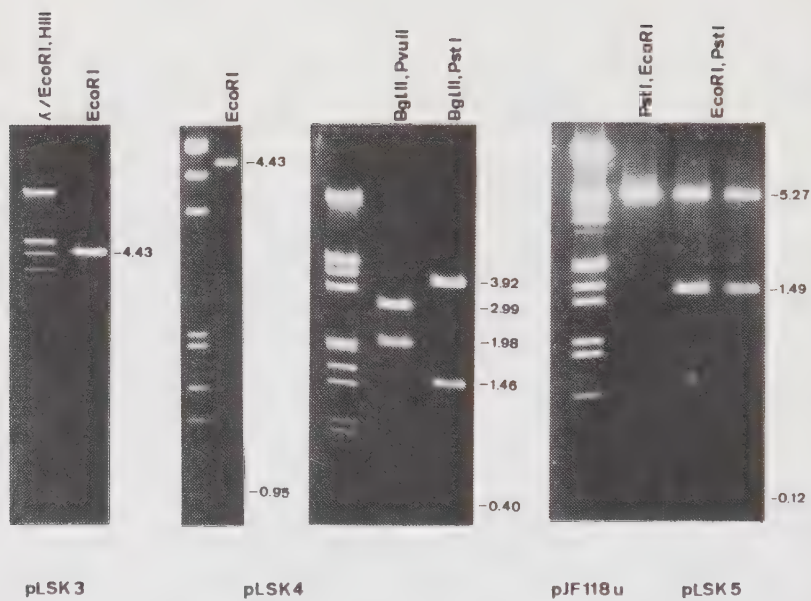


Abb. 18: Restriktionsanalyse der Klone
pLSK3, pLSK4, pLSK5

Das dnaA⁺ Plasmid läßt sich problemlos in WM648 (recA) etablieren. Auch nach Passage durch WM648 und erneuter Transformation in WM1140 (dnaA 508) komplementiert das Plasmid noch die dnaA Mutation.

Damit ist die Klonierbarkeit des dnaA Proteins bestätigt. Die Ursache der beschriebenen Klonierungsschwierigkeiten muß im Vorhandensein bzw. Expression von dnaN, recF oder der Promotor-Region des gyrB Genes liegen.

Interessanterweise tendiert pHPC1 (dnaA⁻, dnaN⁻, recF⁻, gyrB⁻) zur Ausbildung von dimeren und multimeren Plasmidstrukturen (Chakraborty, 1982), auch im recA Stamm.

Zur Überproduktion und Isolierung des dnaA Proteins war der Phage Λ 47.16 konstruiert worden (Chakraborty, 1982; Chakraborty et al, 1983). Er trägt die intakte dnaA-gyrB Region (12.6 kb HindIII-Fragment, Abb. 16). Bei Vermehrung von Λ 47.16 fiel eine extreme Instabilität dieser Phagen auf. Eine genauere Analyse zeigte, daß diese Instabilität ebenfalls auf die dnaA-gyrB Region zurückzuführen ist.

Bei lytischer Vermehrung von Λ 47.16 in recA⁺ Wirten treten häufig Mutanten mit veränderter Plaquemorphologie und verändertem Restriktionsmuster auf (Daten nicht gezeigt).

Λ 47.16 fehlen durch die Substitutionsklonierung in Λ 47.1 (Loenen and Brammar, 1980) die phagenkodierten Rekombinationsproteine (red⁻) und das gam Protein (gam), das die recBC Nuklease inhibiert (Sakaki et al, 1973). In einem recBC⁺ Wirt können daher keine verpackbaren linearen konkatemeren Produkte der späten Replikation entstehen (Zissler et al, 1979). Die gleichzeitige Gegenwart der recA⁺ Funktion in einem recBC⁺ Wirt ermöglicht jedoch die Ausbildung von verpackbaren zirkulären Plasmidkonkatemeren durch Rekombination. In einem recA-recBC⁺ Wirt

können red-gam-Phagen folglich zwar als Plasmid replizieren, aber die Zellen lysieren nicht, da keine verpackbaren Plasmidkonkatemere entstehen (fec^-).

Alle isolierten Mutanten (aus recA⁺ Wirt) vom oben erwähnten Typ sind jedoch gleichzeitig recA unabhängig geworden; sie können auch im recA-Wirt einen produktiven Zyklus durchlaufen.

Die Restriktionsmuster der Mutanten variieren, wobei gleiche Typen wiederholt auftreten. Die einklonierte DNA ist wenig bis viel rearrangiert und fehlt in manchen Phagen völlig (Southernblotanalyse). Es liegt jedoch keine größere Deletion vor (<2 kb), sondern andere DNA ist einrekombiniert.

Von red-gam-Phagen ist bekannt, daß sie durch Einkombinieren der recE Funktion (wenn der kryptische Prophage rac im Wirtschromosom vorhanden ist) zum recA unabhängigen Phänotyp revertieren können (rec_{rev}, Gottesmann et al, 1974).

Daher wurde die Stabilität eines Kontrollphagen im gleichen Wirt getestet. AC10 trägt an Stelle des 12.6 Kb HindIII-Fragmentes der dnaA Region ein 9.6 Kb HindIII-Fragment aus Neurospora crassa (Glutamatdehydrogenase, Kinnaird et al, 1982). AC10 ist stabil. Die Ursache für die Instabilität der Phagen A47.16 ist also durch die dnaA-gyrB Region vermittelt.

In dieses Bild fügen sich die Ergebnisse von Miki et al (1979) ein. Sie verwendeten zur Klonierung des dnaA Gens in pBR322 ebenfalls Restriktionsfragmente, die dnaN, recF und gyrB miteinschlossen. Sie erhielten zwar Transformanten, die dnaA Protein exprimierten; die isolierten Plasmide wiesen jedoch entweder von vornherein ein

verändertes Restriktionsmuster auf oder führten bei weiterer Vermehrung leicht und häufig zu veränderten Plasmiden.

Die Klonierung der dnaN-gyrB Region ohne die dnaA Promotoren (pHPC1) führte zur Ausbildung von multimeren Plasmidformen. Die Klonierung der dnaA-gyrB Region mit den dnaA Promotoren, d. h. aktiver Transkription der Region, resultiert in hoher Rekombinationsfrequenz. Die Transkription bis nach dem dnaN Gen ist in vivo etabliert, die Transkription bis in das gyrB Gen wurde bisher nur in vitro nachgewiesen (Sakakibara et al, 1981).

Zwei Ursachen können für die Instabilität dieser Phagen und Plasmide in Frage kommen und sich auch überlagern: Selektionsdruck für die Eliminierung einer Funktion, die mit der Wirtszelle negativ interferiert oder Anwesenheit einer aktiven Rekombinationsfunktion (Protein oder "site"). Der Selektionsvorteil von Phagen, die eine effiziente Rekombinationsfunktion erhalten haben, kann sich bei A47.16 noch dazu addieren.

Eine genaue Zuordnung der Ursache der Instabilität zu einer in der Region vorhandenen Funktion ist ohne weitere Analysen nicht möglich.

Erhöhte Expression von dnaN und gyrB könnte zu störenden Effekten in Elongation, Initiation und Topologie führen.

Das recF Protein wäre ein guter Kandidat für eine aktive Rekombinationsfunktion. In Wildtypstämmen (recA⁺, recBC⁺) erfolgt Plasmidrekombination hauptsächlich über den "recF Pathway" (Clark, 1980; James and Kolodner, 1983). Er ist recA abhängig.

Das Vorhandensein einer "Chi-site" (hot-spot für Rekombination)

bination) auf dem Fragment könnte den recA abhängigen recBC-Pathway stimulieren (Smith, 1983). Soweit die Sequenz bekannt ist, liegt keine Chi-site mit 100 %iger Homologie vor. Der größere Teil des 12.6 kb HindIII-Fragmentes ist allerdings noch nicht sequenziert.

Es müssen jedoch auch recA unabhängige Rekombinationsprozesse involviert sein. Infektion eines recA-Wirtes führt ebenfalls zur Lyse, wenn auch reduziert gegenüber der Effizienz in recA⁺ Wirten. Miki et al (1979) beobachteten die Instabilität der Plasmide ebenfalls in recA-Stämmen.

Zur einzigen recA unabhängigen Funktion auf dem Phagen könnte die B-Untereinheit der Gyrase beitragen (Naito et al, 1984; Jkeda et al, 1984). Die Beteiligung der Gyrase an diesen Rekombinationsprozessen wird für unwahrscheinlich erachtet, da auch die Klonierung der Region ohne intaktes gyrB Gen problematisch war (Chakraborty, 1982).

Die Beantwortung der Frage nach der molekularen Ursache der Instabilität erfordert eine differenziertere Klonierung der Region und Aufklärung der Transkriptions- bzw. Expressionskontrolle der Region. Die genauen Funktionen von recF Protein sind noch unbekannt; es interferiert mit der recA-Expression, ist im "recE-pathway" involviert und spielt bei der UV induzierten DNA-Synthese eine Rolle (Clark, 1980). Insofern wäre es wohl von Interesse, in welcher Relation die recF Expression zu den Replikationsproteinen dnaA, dnaN und gyrB steht.

B Überproduktion des dnaA Proteins

Zur Untersuchung der Regulation der 16 Kd Transkription und dnaA Transkription war aus in 3.3.1 dargelegten Gründen die Konstruktion eines dnaA überproduzierenden Plasmids erforderlich, dessen Induktionsmechanismus nicht temperaturabhängig ist.

Der Expressionsvektor pJFl18u wurde zu dieser Klonierung verwendet (J.-P. Fürste und E. Lanka, in Vorbereitung). Er trägt den induzierbaren, starken tac Promotor, der aus der -35 Region des trp Promotors und der -10 Region des lac UV5 Promotors mit lac Operator und Shine-Dalgarno-Sequenz des lacZ Gens künstlich zusammengesetzt wurde (Amann et al, 1983). In Gegenwart des lacIq Gens ist der tac Promotor reprimiert und kann mit IPTG induziert werden. Auf dem Vektor ist gleichzeitig das lacIq8-Gen vorhanden. Das lacIq8-Gen ist eine Promotor-Mutante des Wiltyp-Gens. 10 mal mehr Repressorprotein als im Wildtyp wird synthetisiert (Müller-Hill et al, 1968). Hinter dem tac Promotor befindet sich ein Multilinker zur Klonierung von verschiedenen Restriktionsfragmenten, gefolgt von rrnB (5' S RNA und T₁, T₂) zur effektiven Termination der Transkription vom lac Promotor. Resistenzmarker zur Selektion ist das Ampicillin-Gen.

Das 1.6 kb HincII-XhoI dnaA Fragment (Pos. 824 - 2437, Abb. 16) wurde in den SmaI und SalI geschnittenen Vektor gerichtet kloniert. Das Fragment enthält nicht mehr die dnaA-Promotoren, aber die Shine-Dalgarno-Sequenz des dnaA-Gens, das Strukturgen des dnaA Proteins und die ersten Aminosäuren des dnaN Proteins. Zur Transformation wurde eine dnaA-Mutante verwendet (WM1153, dnaA46, recA, lacIq8). Zur Selektion der temperaturresistenten Klone wurden die bei 30°C mit Ap gewachsenen Transformanten

parallel auf Platten mit und ohne IPTG getestet (lmM). Die temperaturresistenten Ap^{r} -Klone enthielten das erwartete Plasmid von 6.9 kb Größe mit dem erwarteten Restriktionsmuster (pLSK5, Abb. 17, 18). Temperaturresistenz der Klone war auch ohne Induktion mit IPTG zu beobachten. Der tac Promotor ist folglich nicht vollständig reprimiert, obwohl in diesem Stamm das lacIq⁸ Gen auf dem Chromosom und auf dem Plasmid vorhanden ist.

Komplementation nach Retransformation in WM1153 bestätigte, daß keine Rekombinante oder Mutante isoliert worden war. Auch im Wildtypstamm läßt sich das dnaA⁺-Plasmid (pLSK5) etablieren (WM1151, recA, lacIq⁸).

Um zu sehen, ob Induktion des tac Promotors auf pLSK5 zur effizienten Überproduktion des dnaA Proteins führt, werden Gesamtzellproteine nach verschiedenen Induktionszeiten in SDS-Polyacrylamidgelen dargestellt.

Induktion von WM1151/pLSK5 bei 37°C bis zu 5h führte zu einer kontinuierlichen Zunahme einer prominenten Bande, die einem 50 Kd Protein entspricht (Abb. 19, B). Nach vierstündiger Induktion des Kontrollstammes WM1151/pJF118u ist hingegen keine Veränderung zu sehen (Abb. 19 A). Nach der Sequenz hat das dnaA Protein ein M_r von 52.5 Kd (Hansen et al, 1982b), nach SDS-Gelen wurde es von verschiedenen Autoren als 48 Kd bis 52 Kd Protein charakterisiert. Zusätzlich gibt es noch einige schwächer induzierte Proteine, z. B. direkt über und unter dem 50 Kd Protein, außerdem bei 45 Kd und 68 Kd.

Der Induktion des lac Operons auf dem Chromosom ist keines der zusätzlichen Proteine zuzuschreiben (WM1151 lac⁺); keine Proteine in der Größenordnung 125 KD (lacZ) und 30 Kd (lacY und lacA) werden induziert (Lewin; 1985).

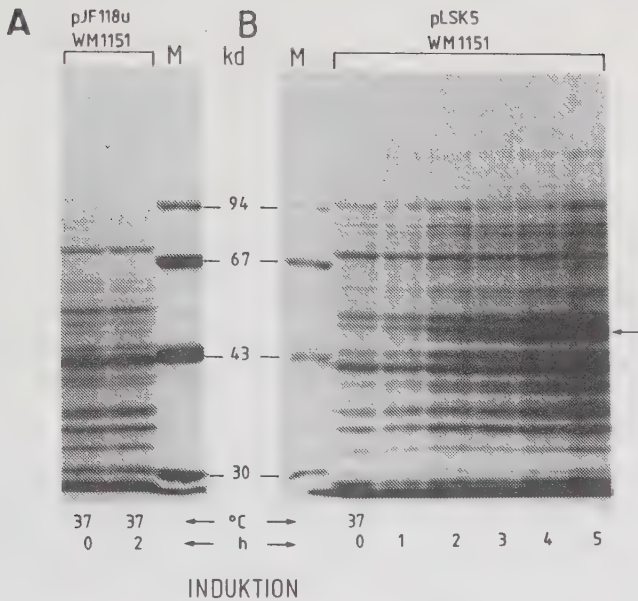


Abb. 19: Induktion des tac Promotors auf pLSK5 (WM1151)
zur Überproduktion von dnaA Protein

WM1151/pJF118u (A) und WM1151/pLSK5 (B) wurden bei 7×10^7 Zellen/ml mit 1mM IPTG induziert; zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen. Gesamtzellproteine (3×10^8 Zellen) wurden im 10 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt. Der Pfeil zeigt die Position des 50 Kd Proteins an.

DnaA abhängige Induktion zusätzlicher Proteine ist von Atlung et al (1984) auch beschrieben worden. Die prominente Bande von 50 Kd ist wahrscheinlich das dnaA Protein.

Zum Nachweis der Überproduktion eines funktionellen dnaA Proteins wurde außerdem in vitro Replikation durch Komplementation getestet (Fuller et al, 1981; 3.1). Der komplementierende Donor-Extrakt wurde aus WM1151/pLSK5 präpariert. Die Zellen, d. h. die dnaA Produktion, waren vorher bei einer Zelldichte von 8×10^7 Zellen/ml für 3h mit 1mM IPTG induziert worden. Der Rezipientenextrakt wurde in diesem Fall aus einer dnaA 204 Mutanten (WM433) isoliert. Beide Extrakte alleine sind inaktiv in der Replikation.

Komplementation einer konstanten Menge an Rezipientenextrakt (für Transkriptionsaktivität optimale Menge) mit steigenden Mengen an WM1151/pLSK5 Extrakt führen zur Stimulierung der Replikation (Abb. 20). Als Template wurde pOC51 (3.1) verwendet.

Im Vergleich dazu wurde Komplementation durch den Donor-Extrakt aus hitzeinduzierten p_L -dnaA plasmidhaltigen Zellen (TCI430, 3.1) gemessen. Die Stimulierung der Replikation durch den Extrakt aus WM1151/pLSK5 ist deutlich höher. Die Proteingehalte beider Donor-Extrakte sind ungefähr gleich; daher ist die dnaA Konzentration im Extrakt aus WM1151/pLSK5 wahrscheinlich höher. Die dnaA Überproduktion durch ptac Transkription ist damit wahrscheinlich effizienter als durch p_L Transkription. Funktionelles dnaA Protein wird nach Induktion des tac Promotors auf pLSK5 überproduziert. Dieses Plasmid war damit zur Untersuchung der 16 Kd und dnaA Transkription in Abhängigkeit von dnaA Protein geeignet.

In induzierten Zellen ist die Wachstumsrate der Zellen reduziert.

Ein negativer Effekt auf die Plasmidreplikation durch die induzierte Transkription sollte auszuschließen sein, da die starken Terminatoren (T_1 , T_2) des rrnB Operons nach dem dnaA Gen liegen. Auch ein störender Effekt der Kotranskription der 5S RNA kann ausgeschlossen werden (Brosius, 1984).

In anderen Arbeiten, in denen die Überproduktion des dnaA Proteins beschrieben ist, wurde keine Auswirkung auf die Wachstumsrate der Zellen beobachtet (Atlung et al, 1984; Churchward et al, 1983). Das Ausmaß der Überproduktion an dnaA Protein könnte die unterschiedliche Wirkung auf die Zelle bedingen.

Die Konsequenzen der Überproduktion des dnaA Proteins für seine Funktion in der Regulation der Initiation werden in der Diskussion behandelt.

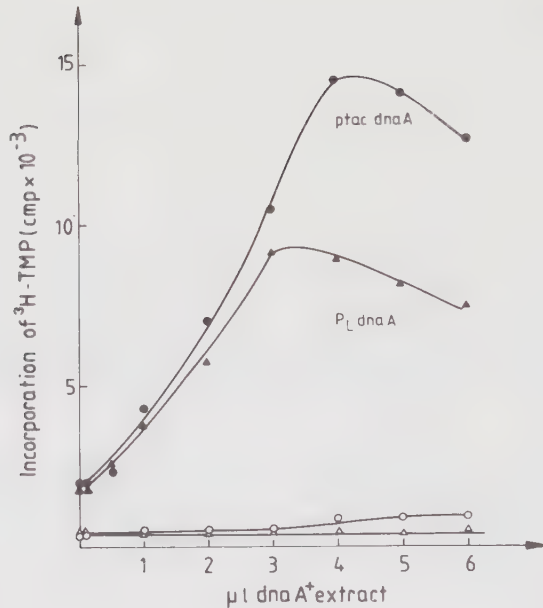


Abb. 20: In vitro Komplementation mit dem *dnaA* Über-
produzentenextrakt aus WM1151/pLSK5

Der Rezipientenextrakt (WM433, *dnaA* 204, 1 µl = 7 µg Protein) wurde mit steigenden Mengen an Überproduzentenextrakt aus WM1151/pLSK5 (gefüllte Kreise) oder aus TC1430/P_L-*dnaA* komplementiert. Als Template wurde pOC51_L verwendet (90 ng). Die Aktivität der Überproduzentenextrakte alleine ist durch offene Symbole dargestellt.

In dieser Arbeit wurden dnaA abhängige Transkriptionsereignisse im Replikationsorigin und die Regulation der dnaA Expression untersucht. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird folgendes Modell für die Regulation der Initiation an oriC vorgeschlagen (Abb. 21):

Die 16 Kd Transkription durchläuft größtenteils den Minimalorigin. Der 16 Kd Promotor wird dabei durch das dnaA Protein im Zellzyklus negativ reguliert. Im de-reprimierten Zustand hemmt die aktive 16 Kd Transkription die Transkription der Promotoren im Minimalorigin. Zum Zeitpunkt der teilweisen Repression der 16 Kd Transkription wird das 16 Kd Transkript von RNaseH prozessiert (im RNA/DNA Hybrid). Das prozessierte 16 Kd Transkript ist die Primer RNA zur Inzeption der "leading" Strang-Synthese in Gegenuhrzeigerrichtung. Die "lagging"-Strang-Synthese im Gegenuhrzeigersinn führt gleichzeitig zur "leading" Strang-Synthese in Uhrzeigerrichtung. Neben der erforderlichen Modulation der 16 Kd Transkription durch das dnaA Protein reguliert das ori-r Transkript als inhibitorische RNA (iRNA) die Initiation negativ. Sie inhibiert das Prozessieren des 16 Kd Transkriptes durch Interaktion mit der 16 Kd RNA (s. Abb. 21). Der ori-r Promotor ist in Gegenwart der starken 16 Kd Transkription weitgehend inaktiv und wird erst nach/bei der Derepression des 16 Kd Promotors transkribiert. Die iRNA verhindert nachfolgende Initiationen bis die Konzentration durch Zellwachstum oder Degradation genügend abgesunken ist.

In diesem Modell ist die p ori-l Transkription normalerweise reprimiert und dient als Reservefunktion ("back-up"-System).

Das dnaA Protein ist dabei das regulatorische Initiatorprotein. Die autoregulierte Transkription des dnaA Gens ermöglicht die Synthese des dnaA Proteins unabhängig von der Wachstumsrate der Zellen (nahezu konstante Konzentration).

Die spezifische Bindung des dnaA Proteins an die Origin-DNA (9 bp Repeat) führt zur notwendigen Akkumulation des dnaA Proteins. Dabei reprimiert es den 16 Kd Promotor und hat eine positive Funktion im Minimalorigin. Beide Funktionen führen zur Auslösung des Initiationsereignisses.

Die postulierten Funktionen der verschiedenen Komponenten in der Initiation werden im folgenden anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Befunde diskutiert:

Das 16 Kd Transkript als Primer

Im dnaA abhängigen in vitro Replikationssystem erfolgt die Initiation der Replikation erst nach vorheriger Repression der Transkription, wenn Minichromosomen mit 16 Kd Region als Template verwendet werden (3.1, Lothar et al, 1984). Initiation der Replikation von Minichromosomen mit Minimalorigin dagegen erfordert nicht diese Repression der Transkription.

Diese templateabhängige Repression der Transkription ist wahrscheinlich auf die Repression der 16 Kd Transkription durch das dnaA Protein zurückzuführen. Mit S1-Mapping konnte gezeigt werden, daß die 16 Kd Transkription in vivo auf dem Chromosom durch das dnaA Protein negativ reguliert wird (Derepression in dnaA Mutanten bei Induktion eines plasmidkodierten dnaA Proteins, 3.3.2). Die Regulation der starken 16 Kd Promotoraktivität konnte ebenfalls anhand von Promotorfusion vor das Galakto-

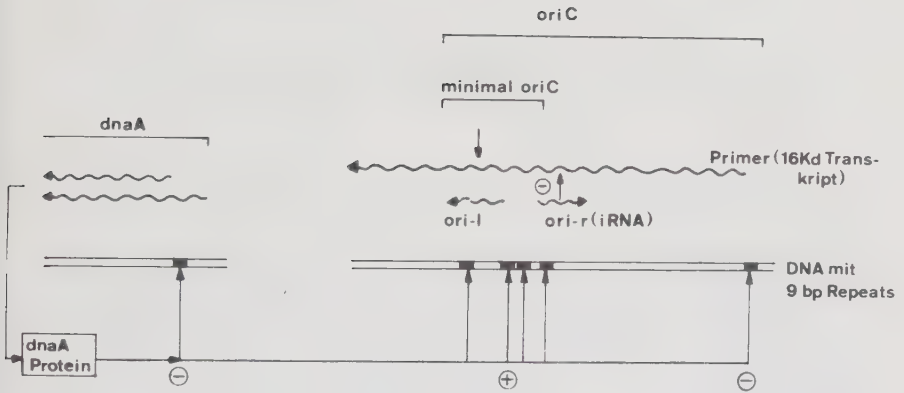


Abb. 21: Modell zur Initiation an *oriC*

Transkripte und *dnaA*-Bindungsstellen (9 bp Repeats) der Originregion und des *dnaA* Gens sind eingezeichnet. Lange vertikale Pfeile symbolisieren die negative oder positive Funktion des *dnaA* Proteins. Kurze vertikale Pfeile zeigen die Interaktion der RNAs im Replikationsorigin und die DNA-Inzeption am prozessierten 16 Kd Primertranskript an. Einzelheiten sind im Text beschrieben.

kinasegen gezeigt werden (in vivo und in vitro, Lothar et al, 1984). Der Repressionseffekt ist wahrscheinlich auf die Bindung des dnaA Proteins an das 9 bp Repeat distal des 16 Kd Promotors verursacht (Abb. 21, Fuller et al, 1984).

Die Repression der 16 Kd Transkription war in diesen Versuchen nie vollständig.

Die S1-Kartierung des 3'Endes des 16 Kd Transkriptes erwies, daß der Hauptanteil der 16 Kd Transkription den Minimalorigin durchläuft (3.2.2). Die kürzeren Transkripte, die dabei nachgewiesen wurden, entstehen durch Prozessierung des 16 Kd Transkriptes durch RNaseH. In RNaseH Mutanten liegt nur das Transkript der vollen Länge vor (3.3.3). Prozessierung des Primertranskriptes ist für die ColE1 Replikation (u. Derivate) beschrieben (Tomizawa et al, 1982; Hillenbrand and Staudenbauer, 1982; Kogoma, 1985).

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist: Das 16 Kd Transkript hat Primerfunktion bei der Initiation von oriC. Zur Initiation ist starke, aber unvollständige Repression der 16 Kd Transkription durch das dnaA Protein erforderlich, um die Prozessierung des 16 Kd Transkriptes zum Primer zu ermöglichen. Der Befund von Hirose et al (1983) unterstützt diese Interpretation. Nur zwei sehr nah beieinanderliegende Inzeptionsstellen der DNA-Synthese im Replikationsorigin wurden überhaupt gefunden. Diese sind zudem Inzeptionsstellen für die "leading" Strang-Synthese in Gegenurzeigersinn (Pos. 71 u. 107, Abb. 9). Eine der beiden Inzeptionsstellen stimmt überein mit einem der prozessierten Produkte des 16 Kd Transkriptes (Pos. 107, Abb. 9). Man kann annehmen, daß wahrscheinlich an dieser Stelle die DNA-Inzeption am 16 Kd Primer stattfindet. Bereits Hirose et al (1983) schlugen

aufgrund der einseitigen DNA-Inzeptionsstellen ein Modell vor, in dem ein asymmetrisches singuläres Initiationsereignis zur bidirektionalen Replikation führt.

Da Prozessierungsprodukte verschiedener Länge vorliegen (3.2.2) muß man eine zusätzliche Regulation postulieren, um DNA-Inzeption am Primer der richtigen Länge zu gewährleisten.

Das ori-r Transkript als iRNA

In Analogie zur Initiationskontrolle von manchen Plasmidsystemen wird für das Transkript des ori-r Promotors (110b) eine inhibitorische Funktion bei der Prozessierung des 16 Kd Transkriptes postuliert.

Bei der ColEI Replikation (u. Derivate) inhibiert die komplementäre RNAI (108b) durch Hybridisierung an das 5'Ende des Primertranskriptes dessen Prozessierung am 3'Ende (z. B. Tomizawa et al, 1982). Bei den Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppe IncFII (Plasmide mit niedriger Kopiezahl und stringenter Kontrolle, R1, R100, NR1 etc.) wird die Translation der mRNA des limitierenden Replikationsproteins (repA1) durch Interaktion mit der komplementären RNA E (91 b, copA) inhibiert, obwohl die Interaktion etwas entfernt vom 5'Ende der mRNA stattfindet (z. B. Womble et al, 1985). Das Gen für das repA1 Protein liegt nahe des Replikationsorigins und die Transkription verläuft vermutlich bis in den Replikationsorigin (in vitro keine Termination). Es ist noch offen, ob dieses Transkript gleichzeitig der Primer der DNA-Synthese ist und ob die Interaktion mit der iRNA gleichzeitig die DNA-Inzeption verhindert.

Beide Systeme verdeutlichen, daß die RNA-RNA Interaktionen über räumliche Distanzen zum Tragen kommen.

Es erscheint attraktiver, eine inhibitorische Funktion des ori-r Transkriptes im Prozessieren des 16 Kd Transkriptes als in der Translationsinaktivierung zu sehen.

Die postulierte iRNA Funktion ist testbar. In Zellen, in denen gleichzeitig Minichromosomen und Plasmide, die das ori-r Transkript kodieren, vorhanden sind, müßte die Kopiezahl der Minichromosomen reduziert sein. Auch gegenüber dem Chromosom müßte das ori-r Transkript Inkompatibilität verursachen. Die bisher durchgeführten Inkompatibilitätsstudien deuten in diese Richtung (Yamaguchi et al, 1982; Stuitje and Meijer, 1983; F. Hansen, pers. Mitteilung, M. Schauzu, pers. Mitteilung).

Die p ori-1 Transkription als Reservefunktion ("back up" System)

Die Replikation der Minichromosomen mit Minimalorigin zeigt, daß im Minimalorigin in Abwesenheit des 16 Kd Transkriptes Initiation ablaufen kann. Der wahrscheinlichste Kandidat für einen alternativen Initiationsmechanismus ist p ori-1 Transkription bzw. die ori-1 Transkripte von 108 und 115b Länge (Lothar and Messer, 1981, Lothar et al, in Vorbereitung). Dieser Mechanismus funktioniert offensichtlich schlechter in der Initiation: Minichromosomen mit Minimalorigin replizieren nur noch unidirektional (Meijer and Messer, 1980; Kaguni und Kornberg, 1984a); ihre Kopiezahl ist reduziert (Chakraborty, 1982) und sie sind instabiler (Huhle, 1984) als Minichromosomen mit 16 Kd Region. Die präzise Kontrolle fehlt (ori-r Transkript, dnaA-Regulation). In Analogie wiederum zu den IncFII-Plasmiden kann man annehmen, daß der ori-1 Promotor normalerweise reprimiert ist und als Reservefunktion dient. Die Anordnung der Gene in der Originregion der IncFII-Plasmide ist die folgende:

repA2-repA1-ori. Das repA1 Gen (Replikationsprotein) hat einen eigenen Promotor, der von dem repA2 Protein (copB) reprimiert wird. Transkription in den Replikationsorigin beginnt normalerweise am repA2 Promotor, das repA1 Protein wird von diesem Transkript translatiert. Dieses Transkript ist, wie bereits erwähnt, möglicherweise auch der Primer. Der repA1 Promotor ist nur aktiv, wenn keine repA2 Transkription vorliegt (Womble et al, 1985; Light et al, 1984).

Das dnaA Protein als Initiatorprotein

Es gab eine Reihe von Daten, die für die autoregulierte Expression des dnaA Proteins sprachen (Hansen and Rasmussen, 1977; Tippe-Schindler et al, 1979; Kellenberger Guijer et al, 1978; Atlung et al, 1984). In dieser Arbeit wurde die autoregulierte Expression des dnaA Proteins in vivo auf dem Chromosom mit S1-Mapping nachgewiesen. In dnaA Mutanten ist bei restriktiver Temperatur die Transkription dereprimiert und in Gegenwart eines dnaA⁺-Plasmides wird die dnaA Transkription auf dem Chromosom reprimiert (3.4.1). Die Aktivität beider dnaA-Promotoren wird durch das dnaA Protein reguliert.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Befunden von Atlung et al (1984) und Braun et al (1985). Sie hatten die Repression der dnaA Promotoren durch Fusion vor Indikatorgens untersucht. Sie konnten zeigen, daß zur Repression der dnaA Transkription das 9 bp Repeat zwischen den beiden dnaA Promotoren erforderlich ist. Die Regulation erfolgt wahrscheinlich durch die Bindung des dnaA-Proteins an das 9 bp Repeat (Abb. 21; Fuller et al, 1984; Braun et al, 1985).

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, daß das dnaA Protein bei Veränderung der Anzahl der Origins in

der Zelle titriert wird (3.4.2). In Gegenwart von Minichromosomen wird dnaA Protein aus dem freien "pool" entzogen und die dnaA Transkription dereprimiert.

Durch die Autoregulation erfüllt das dnaA Protein die Anforderung an ein limitierendes Initiatorprotein im Sinne des Autorepressor-Modells von Sompayrac und Maaløe (1973). Die Konzentration des dnaA Proteins wird dadurch unabhängig von der Wachstumsrate der Zellen konstant gehalten. Nach erforderlicher Akkumulation am Replikationsorigin wird die Initiation ausgelöst.

Die regulatorische Funktion des dnaA Proteins wird auch durch die Konsequenzen der Überproduktion des Proteins belegt. Atlung et al (1984) wiesen nach, daß dnaA Überproduktion zur Überinitiation führt. Das neu initiierte Chromosom wird dann allerdings nicht zu Ende repliziert (abortive Überimiration). Diese Überinitiation macht sich daher nicht in der Gesamt DNA-Konzentration bemerkbar (Atlung et al, 1984; Churchward et al, 1983). Dies würde auch bedeuten, daß zusätzlich zu dem dnaA Protein noch andere Faktoren in der Initiation regulierende Funktion haben.

Das Phänomen der Überinitiation nach dnaA Überproduktion ist aber noch nicht ganz verstanden, denn bei Minichromosomen führt dnaA Überproduktion zur produktiven Überinitiation, ihre Kopiezahl erhöht sich (Meyenburg, pers. Mitteilung). In kältesensitiven dnaA-Suppressormutanten führt die Überinitiation ebenfalls zu einer vollständigen produktiven Replikation des Chromosoms (Kellenberger-Guijer et al, 1978).

Das dnaA Protein hat auf jeden Fall eine regulatorische Funktion in der Initiation und es kann limitierend sein. Die Frage, ob noch zusätzliche Komponenten in die Regu-

lation der Initiationsfrequenz involviert sind, muß noch offen bleiben.

Im Replikationsorigin hat das dnaA Protein zwei Funktionen: Im Minimalorigin ist ^{die Initiation} dnaA abhängig. Die Funktion des dnaA Proteins im Minimalorigin ist noch unverstanden. Die 16 Kd Transkription wird durch das dnaA Protein negativ reguliert. Diese Regulation ermöglicht vermutlich das Prozessieren des 16 Kd Transkriptes durch RNaseH und die Synthese der iRNA (ori-r Transkript).

Die Bedeutung der dnaA regulierten 16 Kd Transkription wird auch an einigen in vivo Daten zur Replikation von Minichromosomen deutlich. Minichromosomen, in denen der 16 Kd Promotor durch einen anderen Promotor ersetzt wurde (lacUV5) haben ebenfalls die niedrige Kopiezahl und Stabilität wie Minichromosomen mit Minimalorigin.

Die zeitliche Kontrolle der Initiation der Replikation von Minichromosomen scheint verschieden zu sein in Abhängigkeit der 16 Kd-Region: Minichromosomen mit Minimalorigin initiieren über den ganzen Zellzyklus verteilt (Leonard und Helmstetter, 1982). Minichromosomen mit 16 Kd-Region dagegen initiieren nur einmal im Zellzyklus und aufeinanderfolgende Initiationsergebnisse am gleichen Molekül liegen eine Generationszeit auseinander (Meyenburg et al, 1984). Dies legt nahe, daß alle in der Zelle vorhandenen Minichromosomen gleichzeitig und auch gleichzeitig mit dem Chromosom initiieren und steht in Einklang mit dem vorgestellten Modell.

Das Priming der DNA-Synthese durch das dnaA regulierte 16 Kd Transkript, dessen Prozessierung durch Interaktion mit dem ori-r Transkript zusätzlich reguliert wird, sollte die im Zellzyklus regulierte Initiation gewährleisten.

Ein weiterführender Weg in der Frage um die Rolle der dnaA regulierten 16 Kd Transkription könnte die Analyse der Transkripte im in vitro Replikationssystem sein. Da man bei der Initiation mit zellzyklusabhängigen Prozessen konfrontiert ist, ist die in vivo Analyse schwer zugänglich. Die dnaA Komplementation in der in vitro Replikation simuliert die Synchronisation einer Zellkultur. Durch Zugabe von steigenden Mengen an dnaA Protein zu einem replikationsinaktiven Rezipientenextrakt wird ein synchrones Initiationsereignis erzielt. In einer solchen Konzentrationsabhängigkeit kann man zu jedem Zeitpunkt - vor, während und nach - der Initiation die Transkriptionsereignisse verfolgen.

Zum einen müßte damit der ausstehende und endgültige Beweis der Repression der 16 Kd Transkription in zeitlicher Relation zur Initiation zu erbringen sein. Zum anderen sollte man Interferenzen/Interaktionen der 16 Kd Transkription mit anderen Transkriptionsereignissen (p ori-l, p ori-r) im zeitlichen Ablauf der Initiation erfassen können.

Erste Voruntersuchungen zeigen, daß bei der in vitro Replikation distinkte RNA-Spezies auftreten. Damit eröffnet dieser Ansatz die Möglichkeit, die Transkriptionsereignisse bei der Initiation zu zerlegen und damit ihre Interaktion und Regulation zu verstehen.

5. Zusammenfassung

RNA-Polymerase und dnaA Protein sind (neben Gyrase) die oriC spezifischen Initiationsproteine.

Das dnaA Protein bindet spezifisch am Replikationsorigin; es erkennt ein konserviertes 9 bp Repeat, das viermal im Minimalorigin vorkommt. Im Minimalorigin werden zwei kurze Transkripte ori-r und ori-l synthetisiert. Rechts neben dem Minimalorigin liegt das 16 Kd Gen, dessen Funktion unbekannt ist. Es wird in Richtung Minimalorigin transkribiert. Distal des 16 Kd Promotors liegt ebenfalls eine dnaA Bindungsstelle. Weder die Funktion des dnaA Proteins noch der Transkripte waren bekannt.

In dieser Arbeit wurden dnaA abhängige Transkriptionsergebnisse im Replikationsorigin und die Regulation der Expression des dnaA Proteins untersucht. Dazu wurden Transkripte vom Chromosom und Minichromosom mit Sl-Mapping analysiert und das Gesamtsystem in in vitro Replikation und Transkription getestet.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- Die 16 Kd Transkription durchläuft den Replikationsorigin
- Die 16 Kd Transkription wird durch dnaA Protein negativ reguliert, wahrscheinlich durch Bindung des Proteins an das 9 bp Repeat
- Das 16 Kd Transkript wird durch RNaseH prozessiert
- Initiation der in vitro Replikation erfordert teilweise Repression der Transkription. Diese Repression ist auf die dnaA regulierte 16 Kd Transkription zurückzuführen

- Die dnaA Transkription ist autoreguliert. Beide Promotoren unterliegen der Autoregulation. Es erfüllt damit eine Anforderung an ein Initiatorprotein, das die Initiationsfrequenz reguliert.

Anhand dieser Ergebnisse und Befunden aus anderen Arbeiten wird ein Modell zur Initiation an oriC vorgeschlagen (Abb. 21).

Das wesentliche Element dieses Modells ist die dnaA regulierte 16 Kd Transkription. Nur das teilweise reprimierte 16 Kd Transkript kann durch RNaseH prozessiert werden und dann als Primer der DNA-Synthese dienen. Durch die Repression der 16 Kd Transkription wird die Expression der iRNA (ori-r Transkript) erlaubt. Es verhindert durch Interaktion mit dem Primertranskript dessen Prozessierung und damit zusätzliche (überzählige) Initiationen. Das singuläre asymmetrische Initiationsereignis führt zur bidirektionalen Replikation. Durch die zweifache Kontrolle wird die präzise Regulation der Initiation im Zellzyklus gewährleistet.

Zusätzlich zur Autoregulation und zur Regulation des 16 Kd Primertranskriptes wird dnaA Protein im Minimalorigin in positiver Weise gebraucht.

LITERATURVERZEICHNIS

-
1. Adachi, T., Mizuuchi, K., Menzel, R. and Gellert, M. 1984. DNA sequence and transcription of the region upstream of the E. coli gyrB gene. Nucl. Ac. Res. 12: 6389-6395.
 2. Aiba, H., Adhya, S. and Crombrugghe, B. de 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact Escherichia coli. J. Biol. Chem. 256: 11905-11910.
 3. Amann, E., Brosius, J. and Ptashne, M. 1983. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for the regulated expression of cloned genes in E. coli. Gene 25: 167-178.
 4. Atlung, T. 1981. Analysis of seven dnaA suppressor loci in E. coli. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 22: 297-314.
 5. Atlung, T. 1984. Allele-specific suppression of dnaA (ts) mutations in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 197: 125-178.
 6. Atlung, T., Clausen, E. and Hansen, F. G. 1984. Autorepression of the dnaA gene of Escherichia coli. Proteins involved in DNA replication: Huebscher, U., Spadari, S. (eds.): p.199-207.
 7. Atlung, T. and Hansen, F. G. 1983. Effect of dnaA and rpoB mutations on attenuation in the trp operon of Escherichia coli. J. Bact. 156: 985-992.
 8. Bachmann, B. J. 1983. Linkage map of Escherichia coli K-12. edition 7. Microbiol. Rev. 47: 180-230.
 9. Bagdasarian, M. M., Izakowska, M. and Bagdasarian, M. 1977. Suppression of the dnaA phenotype by mutations in the rpoB cistron of RNA polymerase in S. typhimurium and E. coli. J. Bact. 130: 577-582.
 10. Berk, A.J. and Sharp, P. A. 1977. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. Cell 12: 721- 732.
 11. Bird, R. E., Louarn, J., Maruscelli, J. and Caro, L. 1972. Origin and sequence of chromosome replication in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 70: 549-566.
 12. Blancar, M. A., Sandler, S. J., Armengod, M., Ream, L. W. and Clark, A. J. 1984. Molecular analysis of the recF

- gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4622-4626.
13. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
 14. Braun, R. E., O'Day, K. and Wright, A. 1985. Autoregulation of the DNA replication gene dnaA in E. coli. Cell 40: 459-469.
 15. Brosius, J. 1984. Toxicity of an overproducing foreign gene product in E. coli and it's use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators. Gene 27: 161-172.
 16. Brosius, J., Cate, R. L. and Perlmutter, P. A. 1982. Precise location of two promoters for the beta-lactamase gene of pBR322. J. Biol. Chem. 257: 9205- 9210.
 17. Brown, M. G. M., Weston, A., Saunders, J. R. and Humphreys, G. O. 1979. Transformation of Escherichia coli C600 by Plasmid DNA at different phases of growth. FEMS Microbiol. Lett. 5: 219-222.
 18. Buhk, H.-J. and Messer, W. 1983. Replication origin region of Escherichia coli: Nucleotide sequence and functional units. Gene 24: 265-279.
 19. Burgers, P. J. M., Kornberg, A. and Sakakibara, Y. 1981. The dnaN codes for the beta subunit of DNA polymerase III holoenzyme of E.coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5391-5395.
 20. Casey, J. and Davidson, N. 1977. Rate of formation and the thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. Nucl. Ac. Res. 4: 1539-1552.
 21. Ceglowski, P. and Trautner, T. A. 1984. Plasmid transformation in Bacillus subtilis: factors affecting the synopsis of donor and recipient DNA. Mol. Gen. Genet. 197: 522-524.
 22. Cesareni, G., Muesing, M. A. and Polisky, B. 1982. Control of colE1 DNA replication: The rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6313-6317.
 23. Chakraborty, T. 1982. Characterization of the dnaA region and isolation of the dnaA product of E. coli. Dissertation FU Berlin.
 24. Chakraborty, T., Yoshinaga, K., Lothar, H. and Messer, W.

1982. Purification of the E. coli dnaA gene product. EMBO J. 1: 1545-1549.
25. Churchward, G., Holmans, P. and Bremer, H. 1983. Increased expression of the dnaA gene has no effect on DNA replication in a dnaA+ strain of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 192: 506-508.
26. Clark, A. J. 1980. A view of the recBC and recF pathways. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 19: 891-899.
27. Cooper, S. and Helmstetter, C. E. 1968. Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli B/r. J. Mol. Biol. 31: 519-540.
28. Danbara, H., Brady, G., Timmis, J. K. and Timmis, K. N. 1981. Regulation of DNA replication: "Target" determinant of the replication control elements of plasmid R6-5 lies within a control element gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4699-4703.
29. Dixon, N. E. and Kornberg, A. 1984. Protein HU in the enzymatic replication of the chromosomal origin of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 424-428.
30. Donachie, W. D. 1968. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. Nature 219: 1077-1079.
31. Evans, I. M. and Eberle, H. 1975. Accumulation of the capacity for initiation of DNA replication in E. coli. J. Bact. 121: 883-891.
32. Filutowicz, M. and Jonczyk, P. 1981. Essential role of the gyrB gene product in the transcriptional event coupled to dnaA-dependent initiation of E. coli chromosome replication. Mol. Gen. Genet. 183: 134-138.
33. Frey, J., Chandler, M. and Caro, L. 1979. The effect of an Escherichia coli dnaAts mutation on the replication of the plasmids colE1, pSC101, R100.1 and RTF-TC. Mol. Gen. Genet. 174: 117-126.
34. Fuller, R.S., Funell, B. E. and Kornberg, A. 1984. The dnaA protein complex with the E. coli chromosomal origin (oriC) and other sites. Cell 38: 889-900.
35. Fuller, R. S., Kaguni, J. M. and Kornberg, A. 1981. Enzymatic replication of the origin of the E. coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7370-7374.
36. Fuller, R. S. and Kornberg, A. 1983. Purified dnaA protein in initiation of replication at the Escherichia coli chromosomal origin of replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5817-5821.

37. Gabain, A. V., Belasco, J. G., Schottel, J. L., Chang, A. C. Y. and Cohen, S. N. 1983. Decay of mRNA in Escherichia coli: Investigation of the fate of specific fragments of transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 653-657.
38. Gellert, M. 1981. DNA topoisomerases. Ann. Rev. Biochem. 50: 879-910.
39. Gottesmann, M.M., Gottesmann, M. E., Gottesmann, S. and Gellert, M. 1974. Characterization of lambda reverse as an E. coli phage carrying a unique set of host-derived recombination functions. J. Mol. Biol. 88: 471-487.
40. Greene, R. S. and Munson, B. R. 1985. In vitro RNA polymerase interaction with a restriction fragment containing the E. coli origin of replication. J. Bact. 161: 183-188.
41. Grossmann, A. D., Erickson, J. W. and Gross, C. A. 1984. The htpR gene product of E. coli as a sigma factor for heatshock promoters. Cell 38: 383-390.
42. Hansen, E. B., Hansen, F. G. and Meyenburg, K. v. 1982. The nucleotide sequence of the dnaA gene and the first part of the dnaN gene of Escherichia coli K-12. Nucleic Acids Res. 10: 7373-7385.
43. Hansen, F. G., Hansen, E. B. and Atlung, T. 1982. The nucleotide sequence of the dnaA gene promoter and of the adjacent rpmH gene, coding for the ribosomal protein L34, of Escherichia coli. EMBO J. 1: 1043-1048.
44. Hansen, F. G., Koefoed, S., Meyenburg, K. v. and Atlung, T. 1981. Transcription and translation events in the oriC region of the E. coli chromosome. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 22: 37-55.
45. Hansen, F. G. and Meyenburg, K. v. 1979. Characterization of the dnaA, gyrB and other genes in the dnaA region of the Escherichia coli chromosome on specialized transducing phages lambda-tna. Mol. Gen. Genet. 175: 135- 144.
46. Hansen, F. G. and Rasmussen, K. V. 1977. Regulation of the dnaA product in E. coli. Mol. Gen. Genet. 155: 219- 225.
47. Hansen, G. E. and Hansen, F. G. 1983. Conditional change of DNA replication control in an RNA polymerase mutant of Escherichia coli. J. Bact. 154: 443-451.
48. Helmstetter, C.E. and Krajewski, C.A. 1982. Initiation of

chromosome replication in dnaA and dnaC mutants
of E. coli B/r F. J. Bact. 149: 685-693.

49. Hendrickson, W. G., Kusano, T., Yamaki, H., Balakrishnan, R., King, M., Murchie, J. and Schaechter, M. 1982. Binding of the origin of E. coli to the membrane. Cell 30: 915-923.
50. Hillenbrand, G. and Staudenbauer, W. L. 1982. Discriminatory function of ribonuclease H in the selective initiation of plasmid replication. Nucl. Ac. Res. 10: 833-853.
51. Hiraga, S. 1976. Novel F prime factors able to replicate in E. coli Hfr strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 198-202.
52. Hirose, S., Hiraga, S. and Okazaki, T. 1983. Escherichia coli origin of replication: Initiation site of deoxyribonucleotide polymerisation at the replication origin of the Escherichia coli chromosome. Mol. Gen. Genet. 189: 422-431.
53. Hirota, Y., Oka, A., Sugimoto, K., Asada, K., Sasaki, H. and Takanami, M. 1981. Structural organization of the region essential for autonomous replication and the recognition frame model. ICN-UCLA Symp. Cell. Biol. 22: 1-12.
54. Hirota, Y., Yasuda, S., Yamada, M., Nishimura, A., Sugimoto, K., Sugisaki, H. and Takanami, M. 1979. Structural and functional properties of the Escherichia coli origin of DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 129-138.
55. Holmes, D. S. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193 - 197.
56. Horiuchi, T., Maki, H. and Sekiguchi, M. 1984. RNase H defective mutants of E. coli: A possible discriminatory role of RNase H in initiation of replication. Mol. Gen. Genet. 195: 17-22.
57. Hughes, P., Squali-Houssaini, F.-Z., Forterre, P. and Kohiyama, M. 1984. In vitro replication of a dam methylated and non-methylated oriC plasmid. J. Mol. Biol. 176: 155-159.
58. Huhle, B. 1984. Stabilität und Kopiezahl von Minichromosomen in Escherichia coli. Diplomarbeit: FU Berlin.
59. Ikeda, H., Aoki, K. and Naito, A. 1982. Illegitimate recombination mediated in vitro by DNA gyrase of E. coli: Structure of the recombinant molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3724-3728.

60. Ikeda, H., Kawasaki, I. and Gellert, M. 1984. Mechanism of illegitimate recombination: Common sites for recombination and cleavage mediated by E. coli gyrase. Mol. Gen. Genet. 196: 546-549.
61. Jacob, F., Brenner, S. and Cuzin, F. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 329-348.
62. Jacq, A., Kohiyama, M., Lothar, H. and Messer, W. 1983. Recognition sites for a membrane-derived DNA binding protein preparation in the E. coli replication origin. Mol. Gen. Genet. 191: 460-465.
63. James, A. A. and Kolodner, R. 1983. Genetic recombination of plasmids in Escherichia coli. Mechanisms of DNA replication and recombination. Cozzarelli, N. R. (ed.). Alan R. Liss Inc., New York.: 761-783.
64. Kaguni, J. M., Fuller, R. S. and Kornberg, A. 1982. Enzymatic replication of E. coli chromosomal origin is bi-directional. Nature 296: 623-627.
65. Kaguni, J. M. and Kornberg, A. 1984a. Replication initiated at the origin (oriC) of the E. coli chromosome reconstituted with purified enzymes. Cell 38: 183-190.
66. Kaguni, J. M. and Kornberg, A. 1984b. Topoisomerase I confers specificity in enzymatic replication of the E. coli chromosomal origin. J. Biol. Chem. 259: 8578-8583.
67. Kahmann, R. 1983. Methylation regulates the expression of a DNA-modification function encoded by bacteriophage Mu. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 639-646.
68. Katz, L., Kingsbury, D. T. and Helinski, D. R. 1973. Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolite repression of the plasmid deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex. J. Bact. 114: 577-591.
69. Kellenberger-Gujer, G., Podhajska, A. and Caro, L. 1978. A cold sensitive dnaA mutant of E. coli which overinitiates chromosome replication at low temperature. Mol. Gen. Genet. 162: 9-16.
70. Kinnaird, J. H., Keighren, M. A., Kinsey, J. A., Eaton, M. and Fincham, J. M. R. S. 1982. Cloning of the am gene (glutamate dehydrogenase) of Neurospora crassa through the use of a synthetic DNA probe. Gene 20: 387-396.
71. Koelling, R. 1983. Promotoren in der dnaA Region und in der oriC Region von E. coli. Diplomarbeit: FU Berlin.

72. Kogoma, T. 1978. A novel Escherichia coli mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. J. Mol. Biol. 121: 55-69.
73. Kogoma, T. 1984. Absence of RNase H allows replication of pBR322 in Escherichia coli mutants lacking DNA polymerase I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7845-7849.
74. Kogoma, T. and Meyenburg, K.v. 1983. The origin of replication, oriC, and the dnaA protein are dispensable in stable DNA replication (sdrA) mutants of Escherichia coli K-12. EMBO J. 2: 463-468.
75. Kornberg, A. 1980. DNA Replication. W. H. Freeman and Company: San Francisco: USA.
76. Kornberg, A. 1984. Enzyme studies of replication of the Escherichia coli chromosome. Proteins involved in DNA replication. Huebscher, U., Spadari, S. (eds.). p. 3-16. Plenum Press: New York and London.
77. Kowalski, D., Kroeker, W. D. and Laskowski, M. Sr. 1976. Mung Bean Nuclease I. Physical, chemical and catalytic properties. Biochemistry 15: 4457-4463.
78. Kowalski, D. and Sanford, J. P. 1982. Action of Mung Bean Nuclease on supercoiled PM2 DNA. J. Biol. Chem. 257: 7820-7825.
79. Krieger, M. and Tobler, J. 1977. Micro-step-exclusion chromatography. Analyt. Biochem. 81: 450-453.
80. Kroeker, W. D. and Kowalski, D. 1978. Gene-sized pieces produced by digestion of linear duplex DNA with Mung Bean Nuclease. Biochemistry 17: 3236-3243.
81. Krueger, J. K. and Walker, G. C. 1984. groEL and dnaK genes of E. coli are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an htpR dependent fashion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1499-1503.
82. Kumar, C. C. and Novick, R. P. 1985. Plasmid pT181 replication is regulated by two countertranscripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 638-642.
83. Kung, F. C. and Glaser, D. A. 1978. dnaA acts before dnaC in the initiation of DNA replication. J. Bact. 133: 755-762.
84. Kusano, T., Steinmetz, D., Hendrickson, W. G., Murchie, J., King, M., Benson, A. and Schaechter, M. 1984. Direct evidence for specific binding of the replication origin of the Escherichia coli chromosome to the membrane. J. Bact. 158: 313-316.

85. Laban, A. and Cohen, A. 1983. The role of recF gene function. Mol. Gen. Genet. 189: 471-474.
86. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
87. Lanka, E., Geschke, B. and Schuster, H. 1978. Escherichia coli dnaB mutant defective in DNA initiation: isolation and properties of the dnaB protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 799-803.
88. Lark, C. 1968. The effect of methionine analogues, ethionine or norleucine on DNA synthesis in Escherichia coli 15T-. J. Mol. Biol. 31: 401-414.
89. Lark, K. G. 1972. Evidence for direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in E. coli 15T-. J. Mol. Biol. 64: 47-60.
90. Lark, K. G., Repko, T. and Hoffman, E. J. 1963. The effect of amino acid deprivation on subsequent DNA replication. Biochim. Biophys. Acta 76: 9-24.
91. Leonard, A. C., Hucul, J. A. and Helmstetter, C. E. 1982. Kinetics of minichromosome replication in Escherichia coli B/r. J. Bact. 149: 499-507.
92. Lewin, B. 1985. Genes. John Wiley & Sons: Inc..
93. Light, J. and Molin, S. 1983. Post-transcriptional control of expression of the repA gene of plasmid R1 mediated by a small RNA molecule. EMBO J. 2:93-98.
94. Light, J. Riise, E., Molin, S. 1985. Transcription and it's regulation in the basic replicon of plasmid R1. Mol. Gen. Genet. 198: 503-508.
95. Loenen, W. A. M. and Brammar, W. J. 1980. A bacteriophage lambda vector for cloning large DNA fragments made with several restriction enzymes. Gene 20: 249-259.
96. Lothar, H., Buhk, H.-J., Morelli, G., Heimann, B., Chakraborty, T. and Messer, W. 1981. Genes, transcriptional units and functional sites in and around the E. coli replication origin. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 22: 57- 77.
97. Lothar, H. and Messer, W. 1981. Promoters in the E. coli replication origin. Nature 294: 376-378.
98. Lothar, H., Orr, E. and Lurz, R. 1983. DNA binding and antigenic specifications of DNA gyrase. Nucl. Acids Res. 12: 901-914.

99. Louarn, J., Bouche, J.-P., Patte, J. and Louarn, J.-M. 1984. Genetic inactivation of topoisomerase I suppresses a defect in initiation of chromosome replication in E. coli. Mol. Gen. Genet. 195: 170-174.
100. Louarn, J., Funderberg, M. and Bird, E. 1974. More precise mapping of the replication origin in Escherichia coli K-12. J. Bact. 120: 1-5.
101. Louarn, J., Patte, J. and Louarn, J.-M. 1977. Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 115: 295-314.
102. Low, R. L., Arai, K.-I. and Kornberg, A. 1981. Conservation of the primosome in successive stages of phiX 174 DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1436-1440.
103. Lusky, M. and Hobom, G. 1979. Inceptor and origin of DNA replication in lambdoid coliphages. I. The lambda DNA minimal replication system. Gene 6: 137-172.
104. Lycett, G. W., Orr, E. and Pritchard, R. H. 1980. Chloramphenicol releases a block in initiation of chromosome replication in a dnaA strain of E. coli K12. Mol. Gen. Genet. 178: 329-336.
105. Maaloe, O. and Kjeldgaard, N. O. 1966. Control of macromolecular synthesis. Benjamin, W. A. (ed.). New York.
106. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
107. Marinus, M.G., Carraway, M., Frey, A.Z., Brown, L. and Arraj, J.A. 1983. Insertion mutations in the dam gene of Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 192: 288-289.
108. Marinus, M. G. and Morris, N. R. 1973. Isolation of DNA methylase mutants of Escherichia coli K-12. J. Bact. 114: 1143-1150.
109. Marsh, R. C. and Worcel, A. 1977. A DNA fragment containing the origin of replication of the E. coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2720-2724.
110. Massy, B. de, Patte, J., Louarn, J.-M., Bouche, J.-P. 1984. oriX: A new replication origin in E. coli. Cell 36: 221/227.
111. Masters, M. and Broda, P. 1971. Evidence for the bidirectional replication of the E. coli chromosome. Nature New Biol. 232: 137-140.
112. Maxam, A. M. and Gilbert, W. 1980. Sequencing end-labeled DNA

with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65: 499-560.

113. Meijer, M., Beck, E., Hansen, F. G., Bergmans, H. E. N., Messer, W., Meyenburg, K. v. and Schaller, H. 1979. Nucleotide sequence of the origin of replication of the *E. coli* K-12 chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 580-584.
114. Meijer, M. and Messer, W. 1980. Functional analysis of minichromosome replication: bidirectional and unidirectional replication from the *Escherichia coli* replication origin, oriC. *J. Bact.* 143: 1049-1053.
115. Menzel, R. and Gellert, M. 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* 34: 105-113.
116. Messer, W. 1972. Initiation of DNA replication in *E. coli* B/r. Chronology of events and transcriptional control of initiation. *J. Bact.* 112: 7-12.
117. Messer, W., Bellekes, U. and Lothar, H. 1985. Effect of dam-methylation on the activity of the *E. coli* replication origin, oriC. *EMBO J.* 4: 1319-1326.
118. Messer, W., Bergmans, H. E. N., Meijer, M., Womack, J. E., Hansen, F. G. and Meyenburg, K. v. 1978. Minichromosomes: plasmids which carry the *E. coli* replication origin. *Mol. Gen. Genet.* 162: 269-275.
119. Messer, W., Dankwarth, L., Tippe-Schindler, R., Womack, J. E. and Zahn, G. 1975. Regulation of the initiation of DNA replication in *E. coli*. Isolation of *oriC* and the control of *oriC* synthesis. *ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* 3: 602-617.
120. Messer, W., Meijer, M., Bergmans, H. E. N., Hansen, F. G., Meyenburg, K. v., Beck, E. and Schaller, H. 1979. Origin of replication, oriC, of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: nucleotide sequence. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 43: 139-145.
121. Meyenburg, K. v. and Hansen, F. G. 1980. The origin of replication oriC, of the *E. coli* chromosome: genes near oriC and construction of oriC deletion mutations. *ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* 19: 137-159.
122. Meyenburg, K. v., Hansen, F. G., Atlung, T., Boe, L., Clausen, I. G., Deurs, B. van, Hansen, E.B., Nielsen, J., Pederson, P.E., Rasmussen, K. v., Riise, E., Skovgaard, O. 1984. Facets on the chromosomal origin of replication, oriC, of *E. coli*. *Molecular Biology of Bacterial*

Growth. Schaechter, M., Neidhardt, F. C., Lygrahan, J., Kjeldgaard, N. O. (eds.). Jones & Banthem Publisher Inc..

123. Meyenburg, K. v., Hansen, F. G., Nielsen, L. D. and Jorgensen, P. 1977. Origin of replication, oriC, of the Escherichia coli chromosome: mapping of genes relative to R.EcoRI cleavage sites in the oriC region. Mol. Gen. Genet. 158: 101-109.
124. Meyenburg, K. v., Hansen, F. G., Nielsen, L. D. and Riise, E. 1978. Origin of replication, oriC, of the Escherichia coli chromosome on specialized transducing phages lambda-asn. Mol. Gen. Genet. 160: 287-295.
125. Miki, T., Kimura, M., Hiraga, S., Nagata, T. and Yura, T. 1979. Cloning and physical mapping of the dnaA region of the Escherichia coli chromosome. J. Bact. 140: 817-824.
126. Mizuno, T., Chon, M.-Y. and Inoye, M. 1984. A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1966-1970.
127. Morelli, G., Buhk, H.-J., Fisseau, C., Lothar, H., Yoshinaga, K. and Messer, W. 1981. Promoters in the region of the E. coli replication origin. Mol. Gen. Genet. 184: 255-259.
128. Morita, M., Sugimoto, K., Oka, A. and Hirota, Y. 1981. Mapping of promoters in the replication origin region of the E. coli chromosome. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 22: 29-35.
129. Murray, N. E., Brammar, W. J. and Murray, K. 1977. Lambdaoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol. Gen. Genet. 150: 53-61.
130. Naito, A. and Ikeda, H. 1984. Homology is not required for recombination by DNA gyrase from E. coli. Mol. Gen. Genet. 193: 238-243.
131. Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. and Vaughn, V. 1984. The genetics and regulation of heatshock proteins. Ann. Rev. Gen. 18: 295-330.
132. Nilsson, G., Belasco, J. G., Cohen, S. N. and Gabain, A. v. 1984. Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in Escherichia coli. Nature 312: 75-77.
133. Nishimura, Y., Caro, L. G., Berg, C. M. and Hirota, Y. 1971. Chromosome replication in E. coli. IV. Control of chromosome replication and cell division by an integrated episome. J. Mol. Biol. 55: 441-456.

134. Nordstroem, K. Molin, S. and Light, J. 1980. Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular physiology of the plasmid R1 system. Plasmid 2: 71-90.
135. Ogawa, T. and Okazaki, T. 1984. Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 193: 231-237.
136. Ogawa, T., Pickett, G. G., Kogoma, T. and Kornberg, A. 1984. RNase H confers specificity in the dnaA-dependent initiation of replication at the unique origin of the Escherichia coli chromosome in vivo and in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1040-1044.
137. Ohmori, H., Kimura, M., Nagaha, T. and Sakakibara, Y. 1984. Structural analysis of the dnaA and dnaN genes of E. coli. Gene 28: 159-170.
138. Oka, A., Sugimoto, K., Takanami, M. and Hirota, Y. 1980. Replication origin of the Escherichia coli K-12 chromosome: the size and structure of the minimum DNA segment carrying the information for autonomous replication. Mol. Gen. Genet. 178: 9-20.
139. Okazaki, T., Hirose, S., Fujiyama, A. and Kohara, Y. 1980. Mapping of initiation sites of DNA replication on prokaryotic genomes. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 19: 429-447.
140. Orr, E., Fairweather, N. F., Holland, B. I. and Pritchard, R. H. 1979. Isolation and characterization of a strain carrying a conditional lethal mutation in the cou gene of Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 177: 103-112.
141. Orr, E., Lother, H., Lurz, R. and Wahle, E. 1984. Escherichia coli DNA gyrase. Proteins involved in DNA replication. Huebscher, U., Spadari, S. (eds.). Plenum Publishing Corporation: p. 395-407.
142. Orr, E., Meacock, P. A. and Pritchard, R. H. 1978. Genetic and physiological properties of an Escherichia coli strain carrying the dnaA mutation T46. In: DNA Synthesis: Present and Future. I. Molineux, M. and Kohiyama, M. (eds.) Plenum Publishing Corporation: 85-99.
143. Orr, E. and Staudenbauer, W. L. 1982. Bacillus subtilis DNA gyrase: purification of subunits and reconstitution of supercoiling activity. J. Bact. 151: 524-527.
144. Plasterk, R. H. A., Vollering, M., Brinkman, A. and Van de Putte, P. 1984. Analysis of the methylation-regulated Mu mom transcript. Cell 36: 189-196.

145. Plasterk, R. H. A., Vrieling, H. and Van de Putte, P. 1983.
Transcription initiation of Mu mom depends on
methylation of the promoter region and a phage encoded
transactivator. *Nature* 301: 344-347.
146. Pritchard, R. H. 1978. Control of DNA replication in bacteria
NATO Advanced Study Institute Series A: Life sciences:
DNA Synthesis: Present and Future: Molineux, M. and
Kohiyama, M. (eds.): p. 1-26.
147. Pritchard, R. H., Barth, P. T. and Collins, J. 1969. Control
of DNA synthesis in bacteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*
19: 263-297.
148. Pruss, G.J., Manes, S. H. and Drlica, K. 1982.
Escherichia coli topoisomerase I mutants:
increased supercoiling is corrected by mutations
near gyrase genes. *Cell* 31: 35-42.
149. Rasmussen, K., Atlung, T., Kerszman, G., Hansen, G. E. and
Hansen, F. G. 1983. Conditional change of DNA replication
in an RNA polymerase mutants of Escherichia coli.
J. Bact. 154: 443-451.
150. Ream, L. W. and Clark, A. J. 1984. Molecular analysis of
the recF gene of E. coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 81: 4622-4626.
151. Ream, L. W., Margossian, L., Clark, A. J., Hansen, F. G. and
Meyenburg, K. v. 1980. Genetic and physical mapping of
recF in Escherichia coli K-12. *Mol. Gen.*
Genet. 180: 115-121.
152. Rosen, J., Ryder, T., Ohtsubo, H. and Ohtsubo, E. 1981.
Role of RNA transcripts in replication incompatibility
and copy number control in antibiotic resistance plasmid
derivatives. *Nature* 290: 794-797.
153. Rouviere-Yaniv, J., Yaniv, M. and Germond, J.-E. 1979.
E. coli DNA binding protein HU forms nucleosome-like
structure with circular double-stranded DNA. *Cell* 17:
265-274.
154. Sakaki, Y., Karn, A. E., Linn, S. and Echols, H. 1973.
Purification and properties of the gam-protein specified
by bacteriophage lambda: an inhibitor of the host
recBC recombination enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 70: 2215-2219.
155. Sakakibara, Y. and Mizukami, T. 1980. A temperature
sensitive Escherichia coli mutant defective in DNA
replication: dnaN, a new gene adjacent to the
dnaA gene. *Mol. Gen. Genet.* 178: 541-553.
156. Sakakibara, Y., Tsukano, H. and Sako, T. 1981. Organization

- and transcription of the dnaA and dnaN genes of E. coli. Gene 13: 47-55.
157. Sakakibara, Y. and Yuasa, S. 1982. Continuous synthesis of the dnaA gene product of Escherichia coli in the cell cycle. Mol. Gen. Genet. 186: 87-94.
158. Sako, T. and Sakakibara, Y. 1980. Coordinate expression of Escherichia coli dnaA and dnaN genes. Mol. Gen. Genet. 179: 521-526.
159. Schaus, N. A., O'Day, K. and Wright, A. 1981. Suppression of amber mutations in the dnaA gene of E. coli K-12 by secondary mutations in rpoB. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 22: 315-323.
160. Shen, V. and Bremer, H. 1977. Chloramphenicol-induced changes in the synthesis of ribosomal, transfer, and messenger RNAs in Escherichia coli B/r. J. Bact. 130: 1098-1108.
161. Smith, G. R. 1983. Chi hotspots of generalized recombination. Cell 34: 709-710.
162. Smith, W. D., Garland, A. M., Herman, G., Enns R. E., Baker, T. A. and Zyskind, J. W. 1985. Importance of state of methylation of oriC GATC sites in initiation of DNA replication in Escherichia coli. EMBO J. 4: 1327-1332.
163. Sompayrac, L. and Maaloe, O. 1973. Autorepressor model for control of DNA replication. Nature N. B. 241: 133-135.
164. Stougaard, P., Light, J. and Molin, S. 1981. Convergent transcription interferes with expression of the copynumber control gene, copA, from plasmid R1. EMBO J. 1: 323-328.
165. Stuitje, A.R. and Meijer, M. 1983. Maintenance and incompatibility of plasmids carrying the replication origin of the E. coli chromosome: evidence for a control region of replication between oriC and asnA. Nucl. Ac. Res. 11: 5775-5791.
166. Stuitje, A. R., Weisbeek, P. J. and Meijer, M. 1984. Initiatn ntD t f an origin of the Escherichia coli chromosome. Nucl. Ac. Res. 12: 3321-3332.
167. Sugimoto, K., Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M., Nishimura, A., Yasuda, Y. and Hirota, Y. 1979. Nucleotide sequence of Escherichia coli replication origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 575-579.

168. Tabata, S., Oka, A., Sugimoto, K., Takanami, M., Yasuda, S. and Hirota, Y. 1983. The 245 bp oriC sequence of the E. coli chromosome directs bidirectional replication at an adjacent region. Nucl. Ac. Res. 11: 2617- 2626.
169. Tanaka, M., Ohmori, H. and Hiraga, S. 1983. A novel type of E. coli mutants with increased chromosomal copynumber. Mol. Gen. Genet. 192: 51-60.
170. Tilly, K., McKittrick, N., Zylicz, M. and Georgopoulos, C. 1983. The dnaK protein modulates the heatshock-response of Escherichia coli. Cell 4: 641-646.
171. Tippe-Schindler, R., Zahn, G. and Messer, W. 1979. Control of the initiation of DNA replication in E. coli. I. Negative control of initiation. Mol. Gen. Genet. 168: 185-195.
172. Tomizawa, J. 1984. Control of colE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. Cell 38: 861-870.
173. Tomizawa, J. 1985. Control of colE1 plasmid replication: initial interaction of RNA I and the primer transcript is reversible. Cell 40: 527-535.
174. Tomizawa, J. and Itoh, T. 1981. Plasmid colE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6096-6100.
175. Tomizawa, J. and Itoh, T. 1982. The importance of secondary structure in colE1 primer formation. Cell 31: 575-583.
176. Tomizawa, J. and Som, T. 1984. Control of colE1 replication: enhancement of binding to RNA I to the primer transcript by the Rom protein. Cell 38: 871-878.
177. Weaver, R.F. and Weissmann, C. 1979. Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: 5' termini of 15 S beta-globin mRNA precursor and mature beta-globin mRNA have identical map coordinates. Nucl. Ac. Res. 7: 1175-1193.
178. Wechsler, J. A. and Gross, J. D. 1971. Escherichia coli mutants temperature sensitive for DNA synthesis. Mol. Gen. Genet. 113: 273-284.
179. Womble, D. D., Dong, X., Wu, R. P., Luckow, V. A., Martinez, A. F. and Rownd, R. H. 1984. IncFII plasmid incompatibility product and it's target are both RNA transcripts. J. Bact. 160: 28-35.
180. Yamaguchi, K., Yamaguchi, M. and Tomizawa, J. 1982. Incompatibility of plasmids containing the replication origin of the Escherichia coli chromosome. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 79: 5347-5351.

181. Yasuda, S. and Hirota, Y. 1977. Cloning and mapping of the replication origin of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5458-5462.
182. Zissler, J., Signer, E.R. and Schaefer, F. 1971. The role of recombination in growth of bacteriophage lambda. I. The gamma gene. Bacteriophage Lambda. Hershey, A.D. (ed.). Cold Spring Harbour: p. 455-475.
183. Zylicz, M., LeBowitz, J., McMacken, R. and Georgopoulos, C. 1983. The dnaK protein of Eis essential in an in vitro DNA replication system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6431-6435.
184. Zyskind, J. W., Cleary, J. M., Brusilow, W. S. A., Harding, N. E. and Smith, D. W.:1983. Chromosomal replication origin from the marine bacterium Vibrio harveyi functions in Escherichia coli: oriC consensus sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1164-1168.
185. Zyskind, J. W., Deen, L. T. and Smith, D. W. 1977. Temporal sequence of events during the initiation process in E. coli deoxyribonucleic acid replication: roles of the dnaA and dnaC gene products and ribonucleic acid polymerase. J. Bact. 129: 1466-1477.
186. Zyskind, J. W., Harding, N. E., Takeda, Y., Cleary, J. M. and Smith, D. W. 1981. The DNA replication origin region of the enterobacteriaceae. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 22: 13- 25.

Lebenslauf

- 1951 geboren am 14. Juli 1951 in Heidelberg
als Tochter des Goldfedernschleifers
Albert Kücherer und seiner Ehefrau
Elisabeth Kücherer geb. Arnold
- 1958 - 1962 Volksschule in Heidelberg - Handschuhsheim
- 1962 - 1967 Mönchhof-Realschule in Heidelberg
Abschluß: Mittlere Reife
- 1967 - 1971 Hölderlin-Gymnasium in Heidelberg,
math.-nat./neuspr. Zweig
Abschluß: Abitur
- 1972 - 1974 Technische Fachschule des Lette-Vereins in
Berlin
Abschluß: Technische Assistentin für
chemische und biologische Laboratorien
- 1974 - 1980 Studium der Biologie an der Freien Univer-
sität Berlin
Abschluß: Diplom-Biologin (Jan. 1980)

Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Regulation
der ribosomalen Ribonuklease-Aktivität von
Saccharomyces cerevisiae"
angefertigt am Institut für Biochemie und
Molekularbiologie unter der Anleitung von
Prof. Dr. E.-R. Lochmann
- 1980 Werkvertrag am Robert-Koch-Institut (BGA)
bei Prof. Dr. Fehrenbach
(März 1980 - Mai 1980)
- 1980 - 1981 Ab Juni 1980 bis Dezember 1981 als Graduier-
tenstipendiatin des DAAD und der "Ligue de
la lutte contre le cancer" im "Laboratoire
de Biologie Moléculaire" an der Université
des Sciences et Techniques du Languedoc in
Montpellier (Frankreich) bei Prof. Dr. Ph.
Jeanteur
Projekt: "Splicing von hnRNA in Adenovirus2
infizierten HeLa-Zellen"
- 1982 - 1985 Im Februar 1982: Beginn der Dissertation un-
ter Anleitung von Prof. Dr. W. Messer am
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik,
Abt. Prof. Dr. T. A. Trautner mit dem Thema
"DnaA regulierte Transkription im Replika-
tionsorigin von *E. coli* und Autorepression
des *dnaA* Gens".

